

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
INSTITUT LUDWIG POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER
Unité de Bruxelles

**UN RETROVIRUS ENDOGENE DEFECTIF
CODE UN ANTIGENE RECONNU PAR DES
LYMPHOCYTES T CYTOLYTIQUES SUR UNE
LEUCEMIE MURINE SPONTANEE**

Vinciane de Brouhoven de Bergeyck

Promoteur: Pr. T. Boon
Co-Promoteur: Pr. C. Remacle

**Dissertation présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université catholique de Louvain
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

1994

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN

FACULTE DES SCIENCES

**UN RETROVIRUS ENDOGENE DEFECTIF
CODE UN ANTIGENE RECONNU PAR DES
LYMPHOCYTES T CYTOLYTIQUES SUR UNE
LEUCEMIE MURINE SPONTANEE**

Vinciane de Brouhoven de Bergeyck

Thèse de doctorat

1994

INSTITUT LUDWIG POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER

Unité de Bruxelles

Avenue Hippocrate, 74 - UCL 74.59

1200 Bruxelles

Téléphone: 02/764.74.59

Fax: 02/762.94.05

Au terme de cette thèse, je tiens à écrire ces quelques lignes, afin d'exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui y ont collaboré de près ou de loin.

J'adresse avant tout mes remerciements au Professeur Thierry Boon pour son accueil à l'Institut Ludwig pour la Recherche sur le Cancer.

Je remercie le Docteur Aline Van Pel de m'avoir formée en biologie cellulaire. Qu'elle trouve ici, ainsi que Madeleine Swinarska, Chantal Vervaeet, Maria Panagiotakopoulos et Anne Gustin, toute ma reconnaissance pour leur aide au cours de la première partie de ce travail.

Je remercie les Docteurs Etienne De Plaen, Patrick Chomez et Olivier De Backer ainsi que Claudine Blondiaux de m'avoir appris les différentes techniques de biologie moléculaire. Ce travail n'aurait certainement pas été ce qu'il est sans leurs nombreux conseils.

Je tiens également à remercier

Les docteurs Aline Van Pel, Etienne De Plaen, Patrick Chomez, Pierre van der Bruggen, Bernard Lethé et Olivier De Backer pour leurs conseils lors de la rédaction de ce travail,

André Tonon pour les expériences de cytométrie en flux,

Le Docteur Guy Warnier, Keota Sounnaraj et Jean-Pierre Matthews pour l'élevage des souris,

Christine Negelman, Tina Van Goetsenhoven, Pascale Mahieu, Jean-Luc Germis et Alex Amato pour la préparation des différents milieux et solutions, ainsi que de la verrerie,

Les autres membres de l'Institut Ludwig pour leur collaboration et leur gentillesse.

J'ai pu réaliser ce travail grâce au soutien du Fonds National de la Recherche Scientifique et à celui de l'Institut Ludwig pour la Recherche sur le Cancer.

Pour terminer, je tiens à remercier mes parents et surtout mon mari pour leurs nombreux encouragements tout au long de cette thèse.

ABREVIATIONS

agprt	adénine phosphoribosyl transferase
aza	azaguanine
BrdU	bromodéoxyuridine
CTL	lymphocytes T cytolytiques
DAP	diaminopurine
dNTP	désoxynucléosides triphosphates
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique
FCS	sérum de veau fœtal
GAM-FITC	anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et couplés à la fluorescéine
HAT	Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
HEPES	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
hgprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IAP	intracisternal A particle, ou particule intraciternale de type A
IL-2	interleukine-2
IL-2r	IL-2 recombinante
LMP	low molecular weight proteins
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
SDS	sodium dodécyl sulfate
tk	thymidine kinase
TNF	facteur de nécrose tumorale
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
---------------	----------

I. INTRODUCTION	3
------------------------	----------

1. IMMUNITE ANTI-TUMORALE	3
----------------------------------	----------

1.1 Les tumeurs expérimentales induisent une réponse immunitaire	3
--	---

1.2 Les tumeurs spontanées expriment des antigènes spécifiques bien qu'elles ne soient pas immunogènes	4
--	---

2. MECANISME DU REJET IMMUNITAIRE DES TUMEURS	6
--	----------

2.1 Rôle des lymphocytes T	6
----------------------------	---

2.2. Obtention de clones de lymphocytes T cytolytiques	7
--	---

3. PRESENTATION DES ANTIGENES AUX CTL	8
--	----------

4. LA TRANSFECTION PERMET D'ISOLER DES GENES CODANT DES ANTIGENES TUMORAUX	12
---	-----------

4.1 Généralités sur la transfection	12
-------------------------------------	----

4.2 Caractérisation de gènes codant des antigènes reconnus par des CTL et identification des mécanismes responsables de leur production.	13
--	----

5 But du travail.	14
--------------------------	-----------

II. RESULTATS	15
----------------------	-----------

1. OBTENTION DE CLONES CTL SPECIFIQUES DE LA TUMEUR LEC	15
--	-----------

2. OBTENTION D'UNE CELLULE RECEPTRICE POUR LA TRANSFECTION	16
---	-----------

3. TRANSFECTION DE L'ADN GENOMIQUE DE CELLULES LEC.aza^R	19
---	-----------

3.1 Etapes de la transfection et de la détection des transfectants	19
--	----

3.2	Obtention de transfectants génomiques exprimant l'antigène LEC-A	19
4.	OBTENTION D'UN COSMIDE CODANT L'ANTIGENE LEC-A	21
4.1	Construction d'une bibliothèque de cosmides des cellules LEC	21
4.2	Transfection de la bibliothèque de cosmides	23
4.3	Encapsidation directe de l'ADN des transfectants cosmidiqes	23
4.4	Obtention d'un cosmide conférant l'expression de l'antigène LEC-A	24
5.	IDENTIFICATION DU GENE CODANT L'ANTIGENE LEC-A	26
5.1	Un fragment de 4,38 kb transfère l'expression de l'antigène	26
5.2	Séquençage et caractérisation du gène codant l'antigène LEC-A	27
5.3	Deux transcrits sont produits à partir de l'élément LEC-A IAP	30
6.	L'ANTIGENE LEC-A	31
6.1	Restriction de l'antigène LEC-A	31
6.2	Un fragment de 105 pb transfère l'expression de l'antigène	32
6.3	Identification de peptides reconnus par les CTL-LEC1:5	33
7.	TRANSPOSITION DE L'ELEMENT LEC-A IAP DANS LEC	34
7.1	Mise en évidence de la transposition	34
7.2	Importance de la transposition pour l'expression de l'antigène	35
7.3	Le génome de LEC contient plusieurs loci susceptibles de coder l'antigène LEC-A	36
8.	EXPRESSION DE L'ANTIGENE LEC-A	37
III.	DISCUSSION	39
1.	LA SEQUENCE CODANT L'ANTIGENE LEC-A APPARTIENT A LA FAMILLE IAP	39
1.1	Particules intraciternales de type A	39
1.2	Séquences IAP	40
1.3	Protéines codées par les séquences IAP	41
2.	L'ELEMENT LEC-A IAP A SUBI UNE TRANSPOSITION DANS LES CELLULES LEC	42
2.1.	Transposition de l'élément LEC-A IAP et expression de l'antigène	43
2.2	Transposition d'éléments IAP et mutagenèse associée	44
3.	L'EXPRESSION DE L'ANTIGENE LEC-A EST UN EVENEMENT RARE	45
3.1	Identification du peptide antigénique	45
3.2.	Recherche de séquences codant le peptide antigénique	45
4.	PERSPECTIVES	46
4.1	Stratégies d'immunisation active	46

4.2 Identification de gènes codant des antigènes reconnus par des CTL à la surface de tumeurs humaines	47
--	----

IV. MATERIEL ET METHODES 49

IV.I BIOLOGIE CELLULAIRE 49

1. CELLULES	49
2. CULTURES CELLULAIRES	52
3. TRANSFECTION	54
4. IDENTIFICATION DE CELLULES EXPRIMANT UN ANTIGENE RECONNU PAR DES ANTICORPS	57
5. IDENTIFICATION DE CELLULES EXPRIMANT UN ANTIGENE RECONNU PAR DES CTL	57
6. RECONNAISSANCE DE CELLULES INCUBEES AVEC DES PEPTIDES SYNTHETIQUES PAR LES CTL-LEC1:5	61

IV.II GENETIQUE MOLECULAIRE 62

1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE	62
2. CONSTRUCTION D'UNE BIBLIOTHEQUE DE COSMIDE	63
3. EXTRACTION D'ADN DE COSMIDES OU DE PLASMIDES	66
4. ENCAPSIDATION DIRECTE	67
5. EXTRACTION D'ADN DE BACTERIOPHAGES	68
6. CARTE DE RESTRICTION DU FRAGMENT DE 9 kb BamHI-BamHI	71
7. OBTENTION DE CLONES DELETES PAR L'EXONUCLEASE III	73
8. SEQUENÇAGE	74
9. NORTHERN BLOT	76
10. REACTIONS DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)	77
11. SOUTHERN BLOT	80

V. ANNEXE I 82

VI. BIBLIOGRAPHIE 88

RESUME

Les tumeurs spontanées de souris ne sont pas immunogéniques. Néanmoins la mutagenèse de la leucémie spontanée LEC a permis d'isoler des variants immunogéniques qui confèrent une protection contre la tumeur parentale. Des clones de lymphocytes T cytolytiques (CTL) reconnaissant les cellules LEC ont été isolés à partir des lymphocytes de souris immunes (Van Pel et al. 1983).

Au cours de ce travail, nous avons isolé et caractérisé la séquence codant l'antigène LEC-A reconnu par le clone CTL-LEC1:5 à la surface des cellules LEC. Pour cloner ce gène, nous avons suivi une démarche similaire à celle ayant permis l'isolement de plusieurs gènes codant des antigènes reconnus par des clones CTL à la surface du mastocytome murin P815. Cette approche est basée sur la transfection de bibliothèques de cosmides construites avec l'ADN des cellules exprimant les antigènes à analyser et sur la détection des transfectants exprimant ces antigènes grâce à leur capacité de stimuler la prolifération du clone CTL adéquat (Wölfel et al. 1987; De Plaen et al. 1988).

Une bibliothèque de cosmides a été construite avec l'ADN des cellules LEC et a été transfectée dans les cellules P1.HTR.K^kD^k. Plusieurs transfectants stimulant la prolifération des CTL-LEC1:5 ont été identifiés. Un cosmide capable de transférer l'expression de l'antigène LEC-A a été obtenu en encapsidant l'ADN génomique d'un transfectant dans des têtes de phage lambda. Un fragment de 4,38 kb codant l'antigène LEC-A a été isolé à partir de ce cosmide. La séquence nucléotidique de ce fragment a été comparée aux séquences répertoriées dans les banques de données. Cette séquence présente de fortes homologues avec les rétrovirus endogènes défectifs appartenant à la famille IAP (intracisternal A particle, ou particule intraciternale de type A). La séquence codant l'antigène LEC-A a été appelée LEC-A IAP. Les CTL-LEC1:5 reconnaissent un peptide antigénique dérivant de la région gag de l'élément LEC-A IAP en association avec la molécule H-2 Dk.

Pour comprendre le mécanisme responsable de l'expression de l'antigène LEC-A par les cellules LEC, nous avons comparé les ADN génomiques des cellules LEC, de deux tumeurs syngéniques non reconnues par les CTL-LEC1:5 et de cellules normales provenant de souris syngéniques. Un Southern blot et des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont permis d'établir que l'élément LEC-A IAP s'est transposé dans la tumeur LEC. L'analyse de l'ADN génomique de variants des cellules LEC n'exprimant plus l'antigène LEC-A ont établi que la transposition de l'élément LEC-A IAP était responsable de l'expression de cet antigène. Il paraît probable que la transposition a pour conséquence d'activer la transcription de cet élément IAP, ce qui entraîne la production de l'antigène (de Bergeyck et al. 1994).

I. INTRODUCTION

1. IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE

1.1 Les tumeurs expérimentales induisent une réponse immunitaire

L'immunothérapie du cancer est basée sur l'espoir que les modifications subies par les cellules tumorales provoquent l'apparition d'antigènes anormaux contre lesquels une réaction spécifique de rejet pourrait être déclenchée ou amplifiée.

L'existence d'antigènes spécifiques des tumeurs a été montrée clairement par des transplantations de tumeurs expérimentales réalisées sur des animaux syngéniques. Ce terme signifie que ces animaux sont de la même race: ils sont homozygotes et génétiquement identiques.

Les premières expériences ont été réalisées avec des sarcomes murins induits par un carcinogène chimique, le méthylcholanthrène. L'injection de ces sarcomes dans des souris syngéniques donne naissance à des tumeurs qui régressent parfois après une phase de croissance initiale. Lorsque les tumeurs ne régressent pas, elles peuvent être éliminées par résection ou par ligature. La plupart des souris qui ont rejeté un sarcome ne développent pas de tumeur lorsqu'elles sont de nouveau inoculées avec des cellules provenant de ce sarcome (Gross 1943). Des résultats similaires ont été obtenus avec les souris dont la tumeur a été éliminée (Figure I.1, souris 4) (Prehn & Main 1957). La protection induite par une tumeur n'est pas due à de légères différences génétiques qui pourraient exister entre l'animal dont provient cette tumeur et l'animal greffé: des souris peuvent être protégées contre leur propre tumeur (Klein et al. 1960). De plus, cette protection est spécifique des tumeurs: des tissus normaux ne procurent aucune protection contre des tumeurs (Figure I.1, souris 2) et des animaux qui sont protégés contre une tumeur ne rejettent pas des greffes de peau (Figure I.1, souris 3). Les

sarcomes induits par le méthylcholanthrène expriment des antigènes différents. En effet, des souris qui sont protégées contre un sarcome développent des tumeurs lorsqu'elles sont injectées avec des cellules provenant d'un autre sarcome (Basombrio 1970). Les tumeurs induites par de fortes doses de rayons ultraviolets expriment aussi des antigènes spécifiques qui diffèrent d'une tumeur à l'autre (Kripke 1974).

Les tumeurs induites par des virus oncogènes constituent une autre classe de tumeurs porteuses d'antigènes capables d'induire une protection dans des animaux syngéniques (Sjögren et al. 1961; Klein & Klein 1964). En effet, une tumeur induite par un virus confère une protection contre d'autres tumeurs induites par le même virus (Klein & Klein 1964). Ces tumeurs portent donc des antigènes communs qui proviennent du virus transformant.

Des animaux syngéniques irradiés de façon sublétales ne peuvent pas être protégés contre des tumeurs induites par des agents mutagènes chimiques ou physiques, ou par des virus oncogènes (Klein et al. 1960; Klein & Klein 1964; Uyttenhove et al. 1980). Par contre, l'irradiation sublétales d'animaux protégés contre une tumeur n'altère pas cette protection (Klein & Klein 1964; Kripke 1974; Uyttenhove et al. 1980). Ces expériences montrent que les différents types de tumeurs expérimentales portent des antigènes spécifiques capables d'induire une réaction immunitaire. En effet, l'irradiation sublétales affecte les réponses immunitaires observées lorsqu'un organisme est mis en contact pour la première fois avec un antigène (réponses primaires), mais pas les réactions immunitaires déclenchées ultérieurement par le même antigène (réponses secondaires). Ceci est dû au fait que les effecteurs des réponses primaires sont plus sensibles aux radiations que les cellules mémoires responsables des réponses secondaires (Tyan & Cole 1963a; Tyan & Cole 1963b).

1.2 Les tumeurs spontanées expriment des antigènes spécifiques bien qu'elles ne soient pas immunogènes

Il existe une différence importante entre les sarcomes induits au méthylcholanthrène et les sarcomes spontanés: ces derniers ne sont pas capables d'induire une protection (Prehn & Main 1957). Hewitt et ses collaborateurs ont montré que 27 tumeurs murines spontanées de différents types histologiques (leucémies,

sarcomes, carcinomes) ne suscitent pas la moindre immunité de transplantation. En effet, ces tumeurs ne régressent jamais et progressent de la même façon dans des animaux syngéniques normaux et dans des animaux préalablement injectés avec des cellules tumorales tuées (Hewitt et al. 1976).

Ces observations semblent indiquer que la présence d'antigènes à la surface des tumeurs expérimentales n'est pas liée à la transformation tumorale. Ces antigènes seraient soit d'origine virale, soit induits par les carcinogènes. En effet, le méthylcholanthrène et les rayons ultraviolets sont non seulement cancérigènes mais aussi mutagènes (Weisburger & Williams 1981). La transformation tumorale et l'acquisition d'antigènes pourraient donc être deux événements indépendants qui se produisent dans la même cellule lorsque la concentration de carcinogène est suffisante. Il existe d'ailleurs une relation entre l'immunogénicité des tumeurs et la dose de carcinogène utilisée: plus la dose de méthylcholanthrène est forte, plus les tumeurs induites sont immunogéniques (Prehn 1975). Les résultats obtenus avec les tumeurs expérimentales pourraient donc ne pas s'appliquer à la majorité des tumeurs humaines.

Thierry Boon et ses collaborateurs ont montré que deux tumeurs spontanées de souris CBA/Ht isolées par Hewitt expriment des antigènes spécifiques qui peuvent devenir les cibles d'un rejet, pour autant que le système immunitaire soit averti de leur présence. Le traitement *in vitro* de cellules des leucémies LEC et LEB par un mutagène puissant, le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, génère des variants incapables de former des tumeurs dans des souris syngéniques. Ces variants ont été appelés "tum⁻" par opposition aux cellules de départ "tum⁺". L'incapacité des variants tum⁻ de produire des tumeurs est due à un rejet immunitaire. En effet, ces variants sont tumorigènes lorsqu'ils sont injectés dans des souris immunodéprimées par une irradiation sublétales. Les variants tum⁻ sont rejetés car ils ont acquis de nouveaux antigènes qui déclenchent une réponse immunitaire. Des souris qui ont rejeté un variant tum⁻ sont partiellement protégées contre l'injection ultérieure de cellules tum⁺ de la tumeur parentale. Ceci indique qu'au cours de la réaction de rejet déclenchée par les antigènes tum⁻, le système immunitaire devient capable de reconnaître des antigènes présents sur la tumeur d'origine. Ces antigènes ne sont pas apparus sur les cellules tumorales après leur adaptation à la culture *in vitro*. En effet, les souris sont aussi protégées contre les tumeurs originales maintenues par transfert *in vivo* dans des souris syngéniques. Ces antigènes sont spécifiques de chaque leucémie: les souris immunisées avec un variant

tum d'une leucémie spontanée ne sont pas protégées contre l'autre leucémie spontanée ni contre la leucémie TH, un thymome radioinduit dans des souris de la même race (Van Pel et al. 1983).

2. MECANISME DU REJET IMMUNITAIRE DES TUMEURS

2.1 Rôle des lymphocytes T

Le rejet de tumeurs induites par des rayons ultraviolets peut être empêché en déprimant artificiellement le système immunitaire par l'administration de sérum anti-lymphocytaire, ou par thymectomie néonatale (Kripke 1974). Ces tumeurs progressent aussi dans des souris "nues" qui ne possèdent pas de thymus (Kripke 1977; Ward et al. 1989). Elles sont rejetées par des souris dont les lymphocytes T auxiliaires ont été détruits par l'injection d'anticorps spécifiques, mais elles progressent dans des souris qui ont été inoculées avec des anticorps dirigés contre les lymphocytes T cytolytiques (CTL) (Ward et al. 1990). Ceci indique que les CTL jouent un rôle très important dans l'immunité anti-tumorale.

Les rates de souris immunisées contre des tumeurs induites par des virus contiennent des lymphocytes capables de lyser ces tumeurs. En effet, l'injection d'un mélange de cellules tumorales et de cellules provenant de la rate d'une souris immunisée contre cette tumeur ne cause pas de tumeur. Par contre, l'inoculation d'un mélange de cellules tumorales et de splénocytes immuns traités avec un sérum anti-thymocytaire et du complément provoque des tumeurs (Tevethia et al. 1974). L'activité cytolytique de ces lymphocytes T peut être mise en évidence *in vitro* en les incubant quelques heures avec des cellules marquées au chrome-51 et en mesurant la quantité de radioactivité relarguée par ces cellules (Leclerc et al. 1973). Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* (Klein et al. 1960) et *in vitro* (Biddison & Palmer 1977; Boon et al. 1980) pour des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques.

2.2. Obtention de clones de lymphocytes T cytolytiques

Des clones de CTL peuvent être générés *in vitro*. Pour établir ces clones, des petits nombres de lymphocytes de souris immunisées contre une tumeur sont mis en culture avec des cellules provenant de la même tumeur, des splénocytes syngéniques et de l'interleukine-2 (IL-2). Les cellules tumorales stimulantes et les splénocytes nourriciers sont tués afin qu'ils n'envahissent pas les cultures. Après quelques jours, une prolifération lymphocytaire est observée dans quelques cultures. Dans des conditions de dilution limite, la majorité de ces cultures sont clonales: elles contiennent une population de lymphocytes dérivant d'une seule cellule. Cette procédure a permis d'obtenir des clones de CTL lysant spécifiquement des cellules provenant de i) tumeurs induites avec des carcinogènes chimiques (Maryanski et al. 1982), ou physiques: rayons ultraviolets (Ward et al. 1989), ou rayons γ (Van Pel & Boon 1982); ii) tumeurs induites avec des rétrovirus (Plata et al. 1975; Brunner et al. 1980; Klarnet et al. 1989; Jiang & Flyer 1992), ou avec les produits des gènes E1A et E1B de l'adénovirus (Kast et al. 1989); iii) tumeurs spontanées (Van Pel et al. 1983).

Ces clones CTL permettent de déterminer facilement si différentes tumeurs expriment le même antigène. Ceci peut être réalisé grâce à des tests de relargage de chrome-51. Ces clones peuvent aussi être utilisés pour établir si une tumeur exprime plusieurs antigènes. Ceci est réalisé en obtenant des variants de cette tumeur qui échappent au pouvoir lytique d'un clone CTL. Ces variants sont analysés afin de déterminer s'ils sont encore lysés par d'autres clones CTL spécifiques de cette tumeur et s'ils peuvent toujours générer une réponse immunitaire lorsqu'ils sont injectés dans des souris syngéniques. Cette procédure a permis d'établir que le mastocytome P815 portait quatre antigènes distincts (Uyttenhove et al. 1983). L'antigène A joue un rôle capital dans le rejet de ce mastocytome: il est absent de tous les variants qui ont formé une tumeur après avoir été presque complètement rejetés par des souris syngéniques. Ces variants ont souvent perdu l'antigène B. Ceci implique donc que les antigènes reconnus *in vitro* par des CTL déclenchent également une réaction immunitaire *in vivo* (Uyttenhove et al. 1983).

Les clones CTL peuvent aussi être amplifiés et utilisés avec de l'IL-2 pour traiter des souris porteuses de tumeurs (Kast et al. 1989). Dans certains cas, il faut en plus

administrer de la cyclophosphamide aux souris pour observer une régression tumorale (Greenberg et al. 1988).

3. PRESENTATION DES ANTIGENES AUX CTL

Les CTL reconnaissent des peptides de 8 à 10 acides aminés provenant de protéines intracellulaires associés à des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (Figure I.2). Ce complexe porte le nom de H-2 chez la souris et de HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme. Les expériences qui ont permis d'établir la manière dont les CTL reconnaissent leur antigène sont décrites ci-dessous.

Zinkernagel et Doherty ont démontré que les CTL provenant de souris immunisées contre un virus lysent des fibroblastes infectés avec ce virus à condition qu'ils expriment les mêmes molécules d'histocompatibilité de classe I que la souris qui a fourni les CTL (Zinkernagel & Doherty 1974). Deux hypothèses avaient été avancées pour expliquer ce phénomène décrit sous le nom de "restriction H-2". L'une postulait la présence d'un récepteur sur le CTL capable de reconnaître à la fois la molécule d'histocompatibilité et l'antigène. L'autre suggérait l'existence de deux récepteurs devant se lier chacun à leur ligand pour que le processus lytique puisse être initié. Dans un cas comme dans l'autre, on considérait que l'antigène était une protéine exprimée à la surface de la cellule.

Townsend et ses collaborateurs ont bouleversé ce concept. Ils ont montré que des CTL reconnaissant des cellules infectées avec une souche du virus influenza étaient incapables de lyser des cellules infectées avec d'autres souches du virus ne différant de la première que par des mutations dans le gène de la nucléoprotéine qui est une protéine intracellulaire (Townsend & Skehel 1984). De plus, un clone de CTL dirigé contre cette protéine lyse des transfectants exprimant des nucléoprotéines délétées de leur partie N- ou C-terminale. Ces CTL ne reconnaissent donc pas l'ensemble de la protéine, mais un fragment situé entre les acides aminés 327 et 386 (Townsend et al. 1985). En outre, ces CTL sont capables de lyser des cellules normales incubées avec des peptides de 14 acides aminés correspondant aux résidus 366 à 379 de la nucléoprotéine. L'induction de la lyse par ces peptides est soumise à la restriction H-2 (Townsend et al. 1986). Des

résultats similaires ont été obtenus avec des peptides synthétiques correspondant aux déterminants antigéniques de protéines transmembranaires reconnues par des CTL, comme les protéines HLA (Maryanski et al. 1986). Ceci démontre que la présentation d'antigènes sous forme de peptides n'est pas limitée aux protéines intracellulaires.

La détermination de la structure tridimensionnelle de plusieurs molécules d'histocompatibilité de classe I a permis de comprendre le rôle de ces protéines dans la présentation des peptides antigéniques aux CTL. Les molécules de classe I sont formées par l'association non-covalente de la $\beta 2$ microglobuline avec une chaîne lourde transmembranaire. La $\beta 2$ microglobuline est la même pour toutes les races de souris et est codée par un gène situé sur le chromosome 2. Les chaînes lourdes sont polymorphes et sont codées par les gènes K, D et éventuellement L du complexe majeur d'histocompatibilité localisé sur le chromosome 17 (Figure I.2). Le gène L n'est pas présent dans le génome des souris d'haplotype H-2^b ou H-2^k (Steinmetz et al. 1981). Les chaînes lourdes sont ancrées dans la membrane cellulaire par leur extrémité carboxyterminale. Leur partie extracellulaire est constituée de 3 domaines présentant des similitudes avec les domaines des immunoglobulines et du récepteur des lymphocytes T. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, situés du côté aminoterminal de la protéine, sont les plus polymorphes. L'analyse cristallographique de molécules de classe I (Madden et al. 1992) a montré que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une structure comprenant un feuillet bêta surmonté de deux hélices alpha (Figure I.3). Cette disposition donne l'image d'une fente dans laquelle un peptide d'une dizaine d'acides aminés peut se loger (Silver et al. 1992).

Pour être antigénique, un peptide doit donc contenir un motif qui lui permet de se lier à une molécule de classe I et former avec cette molécule une structure reconnue par le récepteur des CTL. On appelle "aggrétope" les éléments structuraux du peptide qui lui permettent de se coller à la molécule de classe I et "épitope" sa partie reconnue par le récepteur des lymphocytes. Deux approches ont conduit à la caractérisation des motifs permettant la liaison aux molécules H-2 D^b, D^d, K^b, K^d, K^k et L^d (Engelhard 1994). L'une consiste à comparer la séquence de peptides synthétiques reconnus par des CTL en association avec une de ces molécules. L'autre repose sur l'immunoprécipitation spécifique des différentes molécules d'histocompatibilité, l'extraction des peptides présentés par ces molécules et le séquençage de ces peptides. Les acides aminés dominants sont identifiés (Falk et al. 1991). Cette technique a également permis

d'établir que la majorité des peptides présentés par les molécules de classe I étaient des octamères ou des nonamères. Ces molécules présentent parfois des décamères.

Pour déterminer si les peptides antigéniques se lient aux molécules de classe I dans la cellule ou à sa surface, Yewdell et Bennink ont utilisé la bréfeldine A: un agent qui inhibe le transfert des protéines membranaires vers la surface des cellules (Yewdell & Bennink 1989). Des fibroblastes transfectés avec le gène de l'hémagglutinine sont lysés par des CTL spécifiques de cette protéine (Figure I.4 A). Ces fibroblastes ont été infectés avec le virus de l'influenza et incubés dans du milieu normal ou dans du milieu contenant de la bréfeldine A. En l'absence de bréfeldine A, ils sont lysés par des CTL spécifiques de l'hémagglutinine et par des CTL spécifiques de la nucléoprotéine (Figure I.4 B). En présence de bréfeldine A, ils sont lysés uniquement par les CTL anti-hémagglutinine (Figure I.4 C). Lorsque les fibroblastes incubés en présence de bréfeldine A sont transférés dans un milieu normal, ils deviennent sensibles à la lyse par les CTL anti-nucléoprotéine (Figure I.4 D). Ces résultats indiquent donc que les peptides antigéniques endogènes se lient aux molécules de classe I dans le réticulum endoplasmique et ou dans le Golgi et que les complexes peptide-molécule de classe I sont transportés à la surface des cellules. Les molécules de classe I ont un temps de demi-vie à la surface des cellules variant entre 8 et 10 heures (Davis & Cresswell 1990). C'est pour cette raison que les fibroblastes transfectés restent sensibles à la lyse par les CTL anti-hémagglutinine dans du milieu contenant de la bréfeldine A. Ces expériences ont également montré que les peptides synthétiques exogènes s'associent avec les molécules de classe I présentes à la surface de la cellule. En effet, des fibroblastes transfectés avec le gène de l'hémagglutinine et infectés avec le virus de l'influenza sont lysés par des CTL anti-nucléoprotéine quand ils sont incubés dans du milieu contenant de la bréfeldine A et le peptide synthétique reconnu par ces CTL (Yewdell & Bennink 1989).

Les résultats obtenus par Yewdell et Bennink ont été confirmés par la caractérisation de mutants qui expriment très peu de molécules de classe I. Ces mutants synthétisent des chaînes lourdes et de la $\beta 2$ microglobuline normales. Ils présentent les peptides exogènes, mais pas les peptides endogènes. En fait, ces mutants expriment à leur surface des molécules de classe I vides et labiles qui sont stabilisées par la fixation de peptides exogènes (Townsend et al. 1989; Hosken & Bevan 1990; Ljunggren et al. 1990; Schumacher et al. 1990).

Pour un des mutants, l'origine génétique du défaut a pu être localisée: il présente une délétion homozygote dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité codant les molécules de classe II (Withehead et al. 1985). Deux gènes situés dans cette région ont été isolés (Deverson et al. 1990; Monaco et al. 1990; Spies et al. 1990; Trowsdale et al. 1990). Ils codent des protéines apparentées aux transporteurs de la famille ABC (ATP-binding cassette) qui sont capables de transférer des petites molécules au travers des membranes cellulaires. Les protéines codées par ces deux gènes sont impliquées dans le transport des peptides du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique et ou vers le Golgi. En effet, certains mutants transfectés avec l'un ou l'autre gène peuvent présenter des peptides endogènes aux CTL (Powis et al. 1991; Spies & DeMars 1991). De plus, ces protéines sont localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique et du cis-Golgi (Kleijmeer et al. 1992).

Le mécanisme responsable de la production des peptides endogènes est encore mal connu. Ils pourraient résulter de la dégradation de protéines par des complexes protéolytiques tels que le protéasome et le LMP (Low Molecular weight Proteins). Ces complexes sont situés principalement dans le cytosol des cellules. Le protéasome comprend de 15 à 20 protéines dont le poids moléculaire varie entre 21 et 35 kDa. Le LMP contient 16 polypeptides de faible poids moléculaire (~20-30 kDa) similaires à une partie des sous-unités du protéasome (Brown et al. 1991). Parmi ces polypeptides, deux sont polymorphes et sont codés par des gènes situés dans la région de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (Monaco & McDevitt 1982; Ortiz-Navarrete et al. 1991). Ces gènes ont été isolés, ils se trouvent près des gènes codant les transporteurs de peptides (Glynne et al. 1991; Kelly et al. 1991; Martinez & Monaco 1991). Les peptides endogènes pourraient aussi résulter d'une transcription locale (Boon & Van Pel 1989), ou d'une traduction locale (Fetten et al. 1991).

4. LA TRANSFECTION PERMET D'ISOLER DES GENES CODANT DES ANTIGENES TUMORAUX

4.1 Généralités sur la transfection

La transfection consiste à faire pénétrer de l'ADN purifié dans des cellules en culture. La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à incuber les cellules avec un coprécipité d'ADN et de phosphate de calcium (Graham & Van der Eb 1973). L'ADN du coprécipité parvient jusqu'au noyau et s'intègre de façon permanente dans le génome d'une faible proportion de cellules. Pour beaucoup de lignées cellulaires, cette fréquence est inférieure à 10^{-6} . Des fréquences de 10^{-3} à 10^{-4} sont cependant obtenues avec certaines lignées de fibroblastes et avec les cellules hautement transfectables P1.HTR (Corsaro & Pearson 1981; Van Pel et al. 1985). Chaque transfectant incorpore en moyenne 1.000 kb d'ADN exogène (Perucho et al. 1980). Dans la majorité des cas, l'ADN transfecté s'intègre sous forme d'un long concatémère à un seul endroit du génome qui varie d'un transfectant à l'autre (Pellicer A. et al. 1980).

Etant donné la faible proportion de cellules qui intègrent l'ADN exogène de façon stable, il est nécessaire de disposer d'un système efficace pour les isoler. Le système de sélection le plus ancien utilise l'aminoptérine qui inhibe la voie principale de la synthèse des nucléotides. Ceux-ci sont alors synthétisés par des voies de secours qui nécessitent l'intervention de la thymidine kinase (tk) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (hgprt) (Figure I.5). Des mutants *tk*⁻ ou *hgprt*⁻ ne peuvent pas survivre dans le milieu sélectif "HAT" (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine), à moins qu'ils soient transfectés avec le gène *tk* du virus herpès simplex de type I ou avec le gène *Ecogpt* de *E. coli*. Des systèmes de sélection ne nécessitant pas de cellules réceptrices mutantes ont été décrits. Ils sont basés sur la sensibilité de cellules eucaryotes à des antibiotiques tels que le G418 et l'hygromycine B. Ces aminoglycosides peuvent être inactivés par des phosphotransférases codées par des gènes bactériens.

Dans de nombreux cas, le gène à étudier ne peut être sélectionné. L'ADN contenant ce gène est alors mélangé avec une petite quantité d'un marqueur de sélection et les transfectants exprimant ce marqueur sont analysés. Plus de 80% des cellules exprimant le marqueur sélectif contiennent également l'ADN cotransfecté (Pellicer et al. 1980). Cette technique permet de limiter le nombre de transfectants à analyser.

4.2 Caractérisation de gènes codant des antigènes reconnus par des CTL et identification des mécanismes responsables de leur production.

Thierry Boon et ses collaborateurs ont développé une méthode permettant d'isoler des gènes codant des antigènes reconnus par des CTL. Celle-ci est illustrée à la Figure I.6. Une bibliothèque de cosmides représentative de la totalité du génome des cellules exprimant l'antigène à étudier est construite. L'ADN des différents cosmides est cotransfecté avec un marqueur sélectif dans une cellule réceptrice qui n'exprime pas l'antigène. Après sélection, les transfectants exprimant l'antigène reconnu par les CTL adéquats sont identifiés. Les cosmides intégrés dans leur génome sont alors récupérés et amplifiés pour effectuer des transfections. L'obtention d'un cosmide transférant l'expression de l'antigène permet d'isoler et de séquencer le gène codant l'antigène.

Trois gènes codant des antigènes tum⁺ présentés par des variants immunogéniques du mastocytome P815 ont été isolés et caractérisés (Lurquin et al. 1989; Sibille et al. 1990; Szikora et al. 1990). Ces gènes sont exprimés de façon ubiquitaire. Dans les variants tum⁺ un allèle a subi une mutation ponctuelle dans la région codante. Ces mutations provoquent un changement d'acide aminé responsable de l'apparition de peptides antigéniques reconnus par les CTL (Figure I.7). Ces peptides ont acquis soit un nouvel aggrétope leur permettant de se lier à une molécule de classe I (Lurquin et al. 1989; Szikora et al. 1993), soit un nouvel épitope entraînant leur reconnaissance par des CTL (Sibille et al. 1990). Un gène codant les antigènes A et B du mastocytome P815 a aussi été cloné et analysé. Il est exprimé dans les cellules P815 et dans d'autres mastocytomes, mais il est silencieux dans les mastocytes et dans les tissus normaux à l'exception du testicule et du placenta. L'activation de ce gène est donc responsable de l'apparition du peptide antigénique (Figure I.7) (Van den Eynde et al. 1991).

5 But du travail.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu savoir si les résultats obtenus avec le mastocytome P815 pouvaient être généralisés à d'autres tumeurs. Nous avons donc décidé d'isoler et de caractériser le gène codant l'antigène reconnu par un clone CTL spécifique de la leucémie LEC. Nous avons choisi cette tumeur, car elle est apparue spontanément contrairement au mastocytome P815 qui a été induit au méthylcholanthrène (Dunn & Potter 1957).

II. RESULTATS

1. OBTENTION DE CLONES CTL SPECIFIQUES DE LA TUMEUR LEC

La leucémie spontanée LEC a été isolée dans une souris CBA/Ht. Des cellules provenant de cette tumeur ont été adaptées à la culture *in vitro* et clonées. L'injection de 100 cellules du clone LEC1 dans la cavité péritonéale de souris syngéniques provoque des tumeurs dans plus de 95% des animaux. Le variant tum^r LEC30 a été obtenu en traitant les cellules LEC1 par un agent mutagène puissant, la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Plus de 90% des souris inoculées avec 10⁶ cellules LEC30 développent une réponse immunitaire qui leur permet de rejeter ce variant et de résister à l'injection de 100 cellules LEC1. Ces souris possèdent des lymphocytes qui lysent le variant LEC30 et les cellules LEC1. Des lymphocytes de souris immunes ont été restimulés *in vitro* dans des conditions de dilution limite afin d'obtenir des clones CTL spécifiques des cellules LEC.

Un million de cellules LEC30 ont été injectées dans la cavité péritonéale de souris syngéniques CBA/Ht. Après 35 jours, trois millions de cellules LEC1 irradiées ont été injectées de la même façon dans ces souris. Cinq jours plus tard, les cellules se trouvant dans la cavité péritonéale de ces animaux ont été collectées. Des petits nombres de péritonéocytes (variant de 9 à 1.000) ont été distribués dans des micropuits contenant 10³ cellules LEC1 irradiées, 10⁶ splénocytes syngéniques irradiés et du surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires comme source d'interleukine-2 (IL-2). Après 8 jours d'incubation, des échantillons de chaque microculture ont été transférés dans de nouveaux micropuits contenant des cellules LEC1 ou LEC30 marquées au chrome-51. Après quelques heures, la lyse de ces cellules a été évaluée en mesurant la radioactivité présente dans le surnageant des micropuits. Les microcultures initiées avec 1.000, 243, 81, 27 et 9 lymphocytes contenaient respectivement 39%, 48%, 17%, 6% et 4% de microcultures qui lysaient les deux cibles (Figure II.1). Lorsqu'il y a moins de 20% de microcultures lytiques, on peut

estimer grâce à la loi de Poisson que plus de 90% de ces microcultures résultent de la prolifération d'un seul précurseur de CTL.

Sept clones CTL ont été amplifiés et gardés en culture pendant plus d'un mois. La spécificité de ces clones a été analysée plus en détail. Un test de relargage de chrome-51 a été réalisé sur les cellules LEC1 et LEC30 ainsi que sur des cellules provenant de deux tumeurs syngéniques: la leucémie spontanée LEB et le thymome radioinduit TH. Des blastes, obtenus en incubant les cellules de la rate de souris syngéniques en présence de concanavaline A (un mitogène qui active de façon polyclonale les lymphocytes T), ont aussi été testés. Ceci a permis de déterminer qu'un clone CTL avait perdu son activité lytique, que quatre clones reconnaissaient uniquement les cellules LEC et que deux autres clones reconnaissaient ces cellules et les cellules LEB ou les blastes. L'activité lytique du clone CTL-LEC1:5, un clone "spécifique" des cellules LEC, est montrée à la figure II.2 A. Le terme spécifique n'est pas tout à fait correct car on ne peut pas être certain que ces CTL ne lysent pas d'autres cellules non testées. Tous ces résultats ont été obtenus au laboratoire par A. Van Pel, F. Vessière et T. Boon (Van Pel et al. 1983).

Nous avons décidé d'isoler le gène codant l'antigène reconnu par les CTL-LEC1:5. Cet antigène a été appelé LEC-A.

2. OBTENTION D'UNE CELLULE RECEPTRICE POUR LA TRANSFECTION

Pour isoler le gène codant l'antigène LEC-A, il faut transfecter une bibliothèque de cosmides construite avec l'ADN génomique des cellules LEC dans des cellules qui n'expriment pas cet antigène et identifier les transfectants reconnus par les CTL-LEC1:5. Nous aurions pu transfecter les cosmides dans un variant des cellules LEC n'exprimant plus l'antigène LEC-A. Malheureusement, ces cellules ont une fréquence de transfection inférieure à 10^{-7} . Etant donné que chaque transfectant incorpore environ 22 cosmides recombinants (Perucho et al. 1980), cela implique de traiter plus de 3×10^{11} cellules pour transfecter une bibliothèque de cosmides représentative de la totalité du génome des cellules LEC. En effet, la loi de Poisson permet de calculer qu'il faut ~ 700.000 cosmides recombinants pour que chaque fragment

du génome des cellules LEC ait une probabilité de ~99% d'être présent dans la bibliothèque. Comme il n'est pas possible de traiter autant de cellules, il fallait choisir une cellule réceptrice qui accepte l'ADN exogène à des fréquences plus élevées. Les fibroblastes DAP étaient de bons candidats: ils ont une fréquence de transfection de 10^{-3} - 10^{-4} (Margulies et al. 1983), ils sont du même haplotype que les cellules LEC (H-2^k) et ils ne sont pas lysés par les CTL-LEC1:5 (Figure II.3).

Pour identifier les transfectants exprimant un antigène reconnu par des CTL, on peut analyser soit leur sensibilité à la lyse par les CTL, soit leur capacité à stimuler la prolifération des CTL. Le test de lyse implique de tester tous les transfectants un à un, le test de stimulation permet d'analyser des groupes de 30 transfectants. Ce dernier test repose sur le fait que les CTL dépendent souvent de la présence de leur antigène pour proliférer (Wölfel et al. 1987). La figure II.2 B montre que les CTL-LEC1:5 répondent à cette caractéristique. Pour déterminer si des fibroblastes DAP exprimant l'antigène LEC-A pouvaient être identifiés par le test de stimulation, nous avons effectué une expérience de "reconstruction". Le but de cette expérience est de comparer la prolifération des CTL-LEC1:5 cultivés quelques jours en présence de splénocytes syngéniques irradiés, d'IL-2 recombinante (IL-2r) et soit de fibroblastes DAP, soit de cellules LEC, soit d'un mélange de cellules DAP et LEC. Etant donné que la lyse des cellules LEC est dépendante du nombre de CTL (Figures II.2 A et II.3), la prolifération des CTL a été évaluée en mesurant l'activité lytique des différentes cultures sur ces cellules (Figure II.4). Une prolifération lymphocytaire est observée avec 2×10^3 cellules LEC, mais pas avec 6×10^4 fibroblastes DAP. La prolifération obtenue avec 2×10^3 cellules LEC est nettement inhibée lorsque 6×10^4 fibroblastes DAP sont présents. Le test de stimulation ne permet donc pas d'identifier avec certitude des groupes de 30 transfectants contenant un transfectant exprimant l'antigène LEC-A. Il fallait donc choisir une autre cellule réceptrice qui accepte l'ADN exogène à de bonnes fréquences (10^{-3} - 10^{-4}) et qui permet d'analyser les transfectants avec le test de stimulation. Les cellules P1.HTR.tk⁻ répondaient à ces conditions. Ces cellules ont permis de cloner 4 gènes codant des antigènes reconnus par des CTL à la surface de cellules dérivant du mastocytome P815.

Nous avons donc effectué une expérience de reconstruction avec les cellules hautement transfectables P1.HTR.tk⁻ (H-2^d). Dans ce cas, la prolifération obtenue avec 2×10^3 cellules LEC n'est pas inhibée en présence de 6×10^4 cellules P1.HTR.tk⁻ (Figure

II.4). Puisque les CTL reconnaissent leur antigène sous forme d'un peptide associé à une molécule d'histocompatibilité de classe I, nous avons décidé de transfecter les cellules P1.HTR.tk⁻ avec les gènes de classe I de l'haplotype H-2^k. Les gènes K^k et D^k ont été isolés à partir d'une bibliothèque de cosmides préparée avec l'ADN de foies de souris AKR (Steinmetz et al. 1984; Stephan et al. 1986). Un fragment EcoRI de 10,5 kb contenant le gène K^k a été sous-cloné dans le plasmide pBR322 (Arnold et al. 1984). Un groupe de 5x10⁶ cellules P1.HTR.tk⁻ a été cotransfecté avec 1 µg du plasmide pBR322.H-2K^k, 4 µg du cosmide k12.1 contenant le gène D^k et 1 µg du plasmide pSVtknéo^β qui code la résistance au G418 (Nicolas & Berg 1983). Les transfectants résistants à l'antibiotique ont été clonés. Les clones ont été soumis à un test visuel de lyse avec 2x10⁴ CTL anti-D^k. Sur 38 clones testés, 36 étaient reconnus par le clone CTL alloréactif. Huit clones positifs ont été amplifiés et analysés par cytométrie en flux pour mesurer le niveau d'expression de la molécule K^k, ils étaient tous positifs. Des expériences de reconstruction ont été réalisées avec les trois clones exprimant le plus de K^k. Les résultats obtenus avec un clone sont montrés à la figure II.4, les autres clones se comportent de façon similaire. La prolifération des CTL-LEC1:5 obtenue avec 6x10⁴ cellules P1.HTR.tk⁻ exprimant les molécules K^k et D^k (P1.HTR.K^kD^k) est équivalente à la prolifération observée en l'absence de cellules stimulantes. La stimulation obtenue avec 2x10³ cellules LEC n'est pas inhibée par l'ajout de 6x10⁴ cellules P1.HTR.K^kD^k. Le test de stimulation permet donc d'identifier les transfectants exprimant l'antigène LEC-A en analysant des groupes de 30 transfectants.

Avant de construire une bibliothèque de cosmides avec l'ADN des cellules LEC et de la transfecter dans les cellules P1.HTR.K^kD^k, nous avons préféré nous assurer que ces cellules pouvaient produire et présenter à leur surface l'antigène LEC-A (Figure I.2). En effet, le gène codant cet antigène pourrait être exprimé dans une leucémie, mais pas dans un mastocytome. De plus, les protéines des "protéasomes" et ou des transporteurs de peptides présents dans les cellules LEC et dans les cellules P1.HTR pourraient différer. Ce qui implique que des peptides différents pourraient être produits à partir des mêmes protéines et ou que des peptides différents pourraient être transportés dans le réticulum endoplasmique et ou dans le Golgi de ces cellules. Les cellules P1.HTR.K^kD^k pourraient donc ne pas présenter à leur surface tous les peptides antigéniques restreints par les molécules H-2^k. Nous avons donc décidé de transfecter l'ADN génomique des cellules LEC dans les cellules P1.HTR.K^kD^k.

3. TRANSFECTION DE L'ADN GENOMIQUE DE CELLULES LEC.aza^R

3.1 Etapes de la transfection et de la détection des transfectants

Les étapes de la transfection et de l'analyse des transfectants obtenus sont résumées à la figure II.5. Des groupes de 5×10^6 cellules sont cotransfectées avec 30-60 μg d'ADN génomique de haut poids moléculaire de cellules LEC.aza^R et 1-3 μg d'ADN du cosmide pHMR272 porteur du gène de résistance à l'hygromycine B (Bernard et al. 1985). Après deux jours, les cellules sont transférées dans un milieu contenant de l'hygromycine B. Après quelques jours de sélection, les transfectants résistants à l'antibiotique sont séparés des cellules mortes par centrifugation sur Ficoll. Les transfectants sont ensuite distribués dans des microplaques à raison de 30 cellules par puits. Les microcultures sont dupliquées lorsqu'elles contiennent en moyenne 4×10^4 cellules. Un jour plus tard, on ajoute dans chaque micropuits de la plaque initiale: de 2.000 à 3.000 CTL-LEC1:5, des splénocytes irradiés, de l'IL-2 et du HAT pour inhiber la prolifération des transfectants qui sont tk⁻. Après environ une semaine, les microcultures sont examinées au microscope afin d'évaluer la prolifération des CTL: celle-ci se traduit par le développement d'une couronne de lymphocytes autour des splénocytes et des cellules stimulantes. Cette observation est confirmée par la mesure de l'activité lytique de toutes les microcultures des plaques contenant des puits positifs sur des cellules LEC marquées au chrome-51. Les duplicats des puits positifs sont clonés par dilution limite de façon à obtenir de 100 à 350 clones. Ces clones sont dupliqués et soumis à un test visuel de lyse. Ce test consiste à incuber un duplicat avec des CTL et l'autre avec du milieu. Après 24 heures, les clones lysés sont identifiés au microscope. Les duplicats de ces clones sont amplifiés et soumis à un test de relargage de chrome-51.

3.2 Obtention de transfectants génomiques exprimant l'antigène LEC-A

Les différents clones de cellules P1.HTR.K^{kD} ne se laissent peut-être pas transfecter à la même fréquence. Nous avons donc utilisé les trois clones analysés lors des reconstructions. Au cours de trois expériences, 24 groupes de 5×10^6 cellules ont été transfectées avec l'ADN génomique des cellules LEC (30-60 μg) et avec l'ADN du

cosmide pHMR272 (1-3 μ g). Pour chaque groupe, le nombre de transfectants résistant à l'hygromycine a été évalué en incubant une partie des cellules dans un milieu semi-solide et en comptant le nombre de colonies qui s'y développaient. On a ainsi pu établir que le nombre moyen de transfectants indépendants par groupe était de 2.560. Ce nombre ne différait pas significativement suivant la cellule réceptrice utilisée, mais il variait en fonction de la quantité d'ADN génomique transfectée. Il y avait presque 12 fois plus de transfectants dans les groupes traités avec 30 μ g d'ADN que dans les groupes transfectés avec 60 μ g d'ADN. Au cours du test de stimulation, chaque transfectant a été testé en moyenne 6 fois. Des microcultures stimulant la prolifération des CTL-LEC1:5 ont été identifiées dans 5 groupes de transfection (Figure II.6). Les duplicats des microcultures positives ont été clonés et des clones exprimant l'antigène LEC-A ont été obtenus dans 4 groupes (Table I). Les 4 transfectants génomiques ont été appelés P1.LEC.T1 à T4. La figure II.7 montre que la lyse de ces transfectants est comparable à la lyse des cellules LEC.

Un Southern blot réalisé avec l'ADN génomique des 4 transfectants a été hybridé avec une sonde spécifique du gène de résistance à l'hygromycine. Le nombre de copies et le site d'intégration du cosmide pHMR272 variaient pour chaque transfectant. Ceci confirme que ces transfectants sont différents (Figure II.8).

La fréquence d'obtention de transfectants génomiques exprimant l'antigène LEC-A est de 1/15.360. Etant donné que chaque transfectant incorpore en moyenne 1.000 kb d'ADN exogène sous forme d'un long concatémère (Perucho et al. 1980), cette fréquence est inférieure à la fréquence attendue qui est de 1/6.000 ou de 1/3.000 suivant que le génome des cellules LEC (6×10^6) contient un ou deux gènes codant cet antigène. Ceci peut s'expliquer par les procédés expérimentaux utilisés. Certains transfectants pourraient se diviser plus lentement, ou perdre une partie de l'ADN exogène. Le test de stimulation pourrait posséder un seuil de sensibilité ne permettant pas d'identifier les transfectants exprimant moins d'antigènes que les cellules LEC. De plus, l'expérience de reconstruction effectuée avec les cellules P1.HTR.K^kD^k indique que le test de stimulation ne permet peut-être pas la détection de tous les transfectants exprimant autant d'antigènes que les cellules LEC. Au cours de cette expérience (Figure II.4), l'activité lytique des microcultures ne contenant pas de cellules LEC variait entre 6 et 35%, tandis que l'activité lytique des microcultures contenant des cellules LEC variait entre 37 et 59%. Le faible écart entre les activités lytiques de ces deux types de

microcultures implique que des microcultures contenant des transfectants exprimant l'antigène LEC-A pourraient être considérées comme négatives. D'autre part, des microcultures pourraient être considérées comme positives en stimulation bien qu'elles ne contiennent pas de transfectants exprimant l'antigène LEC-A. Ceci pourrait expliquer que les duplicats de cultures positives en stimulation ne contiennent pas de transfectants exprimant l'antigène LEC-A.

L'obtention de transfectants génomiques exprimant l'antigène LEC-A nous a encouragé à transfecter une bibliothèque de cosmides dans les cellules P1.HTR.K^kD^k de manière à isoler le gène codant l'antigène LEC-A.

4. OBTENTION D'UN COSMIDE CODANT L'ANTIGENE LEC-A

4.1 Construction d'une bibliothèque de cosmides des cellules LEC

Une bibliothèque génomique est une collection de fragments d'ADN clonés représentant toutes les séquences du génome d'une lignée cellulaire, d'un tissu, d'un organe ou d'une espèce vivante donnée. Pour contenir des gènes entiers, ces fragments doivent être suffisamment grands et se recouvrir mutuellement. La plupart des banques génomiques sont construites dans des vecteurs qui dérivent du bactériophage lambda ou dans des cosmides car ils acceptent de grands inserts. Les cosmides sont des vecteurs dans lesquels des fragments d'ADN de ~40 kb peuvent être clonés. Ils possèdent une origine de réplication de plasmide, un ou deux gènes de résistance à un antibiotique et une ou deux séquences "cos" qui proviennent du bactériophage lambda. Des molécules d'ADN contenant 2 sites cos orientés dans le même sens distants de 38 à 52 kb peuvent être encapsidées *in vitro* dans des têtes de phages lambda. Les particules de phages ainsi obtenues sont utilisées pour infecter *Escherichia coli*. Dès que l'ADN du cosmide se trouve dans la bactérie, il se circularise et se réplique comme un plasmide. Les bactéries recombinantes peuvent être sélectionnées au moyen d'antibiotiques appropriés (Figure II.9).

Le vecteur c2RB (Bates & Swift 1983) contient 2 sites cos clonés de part et d'autre d'un site unique pour l'enzyme de restriction SmaI (Figure II.9). Il possède également les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine ainsi qu'un site BamHI unique. La digestion du cosmide c2RB par SmaI puis BamHI produit deux "bras" de 1,7 et 5,1 kb qui contiennent chacun un site cos et un gène de résistance à un antibiotique. Le gène de résistance à la kanamycine est perdu au cours de l'encapsidation.

De l'ADN de haut poids moléculaire des cellules LEC.aza^R a été digéré partiellement par l'enzyme de restriction Sau3AI qui produit des fragments compatibles avec les fragments générés par l'enzyme BamHI. Des fragments d'ADN de 35 à 50 kb, isolés par gradient NaCl, ont été ligués aux deux bras du vecteur c2RB. Une partie du produit de ligation a ensuite été encapsidée *in vitro* dans des extraits de phage lambda. Le nombre de particules obtenues a été calculé en infectant des bactéries ED8767 avec un échantillon du produit d'encapsidation et en sélectionnant les bactéries sur un milieu contenant de l'ampicilline (Figure II.9). Ceci a permis d'établir que nous disposions d'environ $1,7 \times 10^6$ cosmides indépendants.

L'étape suivante a consisté à produire de l'ADN de ces cosmides en grande quantité pour le transférer. Une partie du produit d'encapsidation a été utilisé pour infecter 16 groupes de bactéries ED8767. Un échantillon de chaque infection a été étalé sur un milieu contenant de l'ampicilline. Ceci a permis d'estimer qu'il y avait en moyenne 43.700 cosmides par groupe (Table II). Après amplification des 16 groupes de bactéries infectées dans un milieu contenant de l'ampicilline, l'ADN cosmique a été extrait. Pour chaque groupe de cosmides, 2 µg d'ADN ont été digérés par l'enzyme de restriction EcoRI. Cet enzyme a été choisi car 2 sites EcoRI bordent le site BamHI utilisé pour cloner les fragments d'ADN génomique. Les produits de digestion ont été séparés dans un gel d'agarose 0,7%: chacun d'eux forme une trainée continue avec une bande intense à 5,1 kb qui correspond au vecteur. La trainée correspond à un ensemble de fragments de taille variable provenant de la digestion des inserts: elle indique qu'il n'y a pas eu de perte de diversité majeure au cours de l'amplification des cosmides.

Chaque séquence du génome des cellules LEC a une probabilité de 99,06 % d'être représentée au moins une fois parmi les 16 groupes de cosmides. Cette probabilité a été calculée grâce à la loi de Poisson, en considérant que chaque cosmide possède un

insert de 40 kb et que le génome des cellules LEC a une taille de 6×10^6 kb. Pour que chaque cosmide ait une chance d'être intégré dans le génome d'un transfectant, il faut obtenir au minimum 2.000 transfectants par groupe de cosmides.

4.2 Transfection de la bibliothèque de cosmides

La procédure utilisée pour les transfections d'ADN génomique a été appliquée pour transfecter l'ADN des 16 groupes de cosmides dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.6. Pour chaque groupe de cosmides, environ 6.000 transfectants indépendants résistant à l'hygromycine B ont été obtenus et leur capacité à stimuler la prolifération des CTL-LEC1:5 a été analysée (Table II). Des transfectants exprimant l'antigène LEC-A ont été obtenus avec l'ADN des groupes de cosmides 9 et 11: ils ont été appelés P1.LEC.TC9.1 et TC11.1. Une analyse par Southern blot a montré que le nombre de copies et le site d'intégration du cosmide pHMR272 dans l'ADN de ces transfectants sont différents.

4.3 Encapsidation directe de l'ADN des transfectants cosmidiques

L'encapsidation directe de l'ADN de transfectants cosmidiques permet de récupérer facilement des morceaux d'ADN exogènes intégrés dans leur génome (Lau & Kan 1983). Pour ce faire, l'ADN génomique des transfectants est mis en présence d'extraits de phage lambda. Les séquences situées entre 2 sites cos orientés dans le même sens et distants de 38 à 52 kb sont encapsidées (Figure II.10). Lorsqu'un gène de résistance à un antibiotique provenant des vecteurs utilisés lors de la transfection est présent entre les sites cos, les bactéries infectées avec le produit d'encapsidation peuvent être sélectionnées. Ces conditions impliquent que pour isoler un cosmide portant une séquence particulière, il faut souvent appliquer cette procédure à plusieurs transfectants ayant intégré cette séquence.

De l'ADN génomique (0,8 µg) des transfectants P1.LEC.TC9.1 et P1.LEC.TC11.1 a été encapsidé dans des extraits de phage lambda. Une fraction des produits d'encapsidation a été utilisée pour infecter des bactéries ED8767. Celles-ci ont été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline. Le comptage des colonies bactériennes a permis d'établir que les transfectants ont produit respectivement ~12.300

et ~3.400 cosmides. La diversité de ces cosmides a été évaluée en clivant l'ADN cosmidique extrait à partir des bactéries de quelques colonies par l'enzyme de restriction EcoRI et en séparant le produit de la digestion par électrophorèse sur gel d'agarose. Six colonies du transfectant P1.LEC.TC9.1 contenaient quatre cosmides différents et onze colonies du transfectant P1.LEC.TC11.11 produisaient quatre cosmides différents. Le même cosmide a été obtenu à partir d'une colonie du transfectant P1.LEC.TC9.1 et de six colonies du transfectant P1.LEC.TC11.11. L'ADN de ce cosmide a été transfecté dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.6. Un test visuel de lyse a été effectué sur 210 transfectants: aucun n'était lysé par les CTL-LEC1:5.

Trois fractions du produit d'encapsulation du transfectant P1.LEC.TC9.1 correspondant chacune à environ 4.000 cosmides et la totalité du produit d'encapsulation du transfectant P1.LEC.TC11.1 ont été utilisées pour infecter des bactéries ED8767. Après chaque infection, l'ADN cosmidique de l'ensemble des bactéries recombinantes a été extrait et transfecté. Les transfectants obtenus avec les différents groupes de cosmides étaient incapables de stimuler la prolifération des CTL-LEC1:5.

4.4 Obtention d'un cosmide conférant l'expression de l'antigène LEC-A

Avant d'obtenir d'autres transfectants cosmidiques exprimant l'antigène LEC-A, nous avons décidé de comprendre comment l'encapsulation de l'ADN des transfectants P1.LEC.TC9.1 et P1.LEC.TC11.1 pouvait produire un cosmide identique. Il était extrêmement peu probable que ce cosmide soit commun aux groupes de cosmides 9 et 11. Par contre, les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.6 répondaient aux conditions nécessaires à son obtention: elles ont été transfectées par le cosmide k12.1 contenant le gène D^k et par les plasmides pBR322.H-2K^k et pSVtknéoβ qui possèdent un gène de résistance à l'ampicilline. L'encapsulation de l'ADN des cellules non transfectées produit effectivement ce cosmide.

Nous avons donc construit une nouvelle cellule réceptrice. Les cellules P1.HTR.tk^k ont été cotransfectées avec 4 µg d'ADN d'un fragment EcoRI-HindIII de 8,5 kb contenant le gène D^k, 4 µg d'ADN du plasmide pBR322.H-2K^k et 3 µg d'ADN du plasmide pSVtknéoβ. Les cellules traitées ont été clonées par la technique de dilution limite en présence de G418. Les 26 clones obtenus ont été soumis à un test visuel de lyse avec les clones CTL cl1D:16 et P1.K^k:8 spécifiques respectivement des molécules

D^k et K^k. 18 clones étaient lysés par les CTL anti-D^k, 1 clone était lysé par les CTL anti-K^k et 2 clones étaient reconnus par les 2 types de CTL. Ils ont été appelés P1.HTR.K^kD^k cl.1b et cl.2b.

Environ 33.000 et 64.000 transfectants ont été obtenus en transfectant plusieurs fois l'ADN des groupes de cosmides 9 et 11 dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b. Dans deux groupes de cellules traitées avec l'ADN des cosmides du groupe 11, nous avons trouvé des transfectants exprimant l'antigène LEC-A. Cependant, aucun cosmide n'a été récupéré en encapsidant 1 µg d'ADN du transfectant P1.LEC.TC11.11. L'encapsidation d'1 µg d'ADN du transfectant P1.LEC.TC11.12 a produit environ 8.250 cosmides. 14 cosmides ont été analysés. Ils étaient tous identiques. L'ensemble des cosmides générés par ce transfectant ne confèrait pas l'expression de l'antigène LEC-A.

Etant donné que les groupes de cosmides 9 et 11 ne permettaient pas d'obtenir facilement des transfectants exprimant l'antigène LEC-A, nous avons décidé de tester de nouveaux groupes de cosmides. L'ADN de 24 groupes d'environ 40.000 cosmides indépendants a été cotransfecté dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b avec l'ADN de pHMR272. Pour chaque groupe de cosmides, environ 5.000 transfectants résistant à l'hygromycine B ont été analysés avec le test de stimulation (Table III). Deux transfectants exprimant l'antigène LEC-A ont été obtenus avec l'ADN des groupes de cosmides 36 et 42. Environ 1.500 cosmides ont été obtenus en encapsidant 1 µg d'ADN du transfectant P1.LEC.TC42.1. 14 cosmides ont été analysés. Ils étaient tous identiques. L'ensemble des cosmides ne transférait pas l'expression de l'antigène LEC-A. L'encapsidation d'1 µg d'ADN du transfectant P1.LEC.TC36.1 a produit plus de 50.000 cosmides. 11 cosmides différents ont été identifiés en analysant 19 cosmides. L'ensemble des cosmides produits par ce transfectant conféraient l'expression de l'antigène LEC-A à très haute fréquence. En effet, des groupes de 25 transfectants stimulaient tous la prolifération des CTL-LEC1:5. Pour isoler le cosmide codant l'antigène LEC-A, nous avons décidé de transfecter des groupes contenant de moins en moins de cosmides. Des groupes de 158, 144 et 67 cosmides transféraient tous l'expression de l'antigène. Cinq groupes de six cosmides ont alors été transfectés. Les groupes 1 et 5 étaient positifs. Ces deux groupes contenaient un cosmide identique: le cosmide 2 du groupe 1 (P1.C2) et le cosmide 3 du groupe 5 (P5.C3). Le cosmide P5.C3 a été amplifié et transfecté dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b avec le cosmide pHMR272. Il conférait l'expression de l'antigène LEC-A (Figure II.11). L'analyse des

produits de digestion de ce cosmide par différents enzymes de restriction a permis d'estimer sa taille: environ 48 kb.

5. IDENTIFICATION DU GENE CODANT L'ANTIGENE LEC-A

5.1 Un fragment de 4,38 kb transfère l'expression de l'antigène

Pour identifier la région du cosmide P5.C3 codant l'antigène LEC-A, nous avons décidé de sous-cloner des fragments de ce cosmide, de les transférer dans les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b et d'évaluer la sensibilité des populations de transfectants à la lyse par les CTL-LEC1:5.

L'ADN du cosmide P5.C3 digéré par l'enzyme de restriction ScaI transfère toujours l'expression de l'antigène LEC-A (Figure II.11). Ceci indique que cet enzyme n'inactive pas la séquence codant l'antigène. Dès lors, les fragments obtenus en clivant le cosmide P5.C3 par l'enzyme ScaI ont été séparés par électrophorèse, isolés et transfectés individuellement. Des transfectants exprimant l'antigène LEC-A ont été obtenus avec un fragment de 20 kb (Figure II.11). Des adaptateurs SmaI-EcoRI ont été ligués à ce fragment qui a ensuite été cloné dans les sites EcoRI du phage EMBL3A. Un phage recombinant portant le fragment de 20 kb a été obtenu. L'ADN de ce phage a été clivé avec l'enzyme BamHI. Les fragments BamHI-BamHI ont été clonés dans le plasmide pTZ18R et transfectés. Un fragment de 9 kb cloné dans pTZ18R transfère l'expression de l'antigène LEC-A (Figure II.11). La figure II.12 montre une carte de restriction de ce fragment.

Le plasmide contenant l'insert BamHI de 9 kb a été clivé par les enzymes EcoRI, SmaI ou XbaI. Une partie des produits de digestion a été circularisée afin d'obtenir des plasmides contenant les fragments EcoRI-BamHI, SmaI-BamHI ou BamHI-XbaI. Les fragments EcoRI, SmaI et XbaI ont été sous-clonés dans le plasmide pTZ18R (Figure II.12). Les transfectants obtenus avec ces constructions ne sont pas lysés par les CTL-LEC1:5.

L'excision du fragment Sall-Sall de 1,57 kb du plasmide contenant l'insert BamHI de 9 kb abolit l'expression de l'antigène LEC-A. Le fragment Sall-Sall de 1,57 kb a été cloné dans les deux orientations dans le plasmide d'expression pSVK3. Il ne confère pas l'expression de l'antigène. Ce fragment contient donc des séquences qui favorisent l'expression de l'antigène, mais il ne le code pas. C'est pour ces raisons que l'autre extrémité du fragment BamHI-BamHI de 9 kb a été déléetée progressivement par une technique basée sur l'utilisation de l'exonucléase III. Des plasmides contenant des inserts de plus en plus petits ont été obtenus et transfectés (Figure II.12). Le clone ExoIII 17b (4,38 kb) est le plus petit clone capable de conférer l'expression de l'antigène LEC-A (Figure II.11).

5.2 Séquençage et caractérisation du gène codant l'antigène LEC-A

A. L'antigène LEC-A est codé par un rétrovirus endogène défectif appartenant à la famille IAP

La séquence du clone ExoIII 17b a été déterminée (Figure II.13) et comparée aux séquences d'ADN introduites dans les banques de données EMBL et Genbank. Les 4.236 premiers nucléotides de cette séquence présentent une homologie très importante avec des rétrovirus endogènes défectifs appartenant à la famille IAP (Annexe I).

Les séquences IAP ressemblent fort aux rétrovirus. C'est pour cette raison que les caractéristiques principales des rétrovirus sont décrites avant l'analyse de l'élément IAP codant l'antigène LEC-A.

B. Comparaison des rétrovirus et des éléments IAP.

La figure II.14 A résume le cycle de vie des rétrovirus. La première phase du cycle correspond à la pénétration du virus dans la cellule-hôte, à la conversion de l'ARN génomique en ADN bicaténaire par la transcriptase inverse et à l'intégration de cet ADN dans l'ADN génomique de la cellule-hôte. Le génome viral porte alors le nom de provirus. Il comporte deux longues répétitions terminales (LTR) de même orientation qui encadrent un segment central plus long. Ce segment peut être divisé en quatre régions: gag, pro, pol et env. Ces régions codent respectivement: i) les composants de la capsid virale (MA, CA et NC); ii) des protéases (PR); iii) des transcriptases inverses (RT) et des intégrases (IN); iv) des protéines d'enveloppe. Le provirus comprend aussi

deux régions impliquées dans la transcription inverse: une séquence complémentaire à l'extrémité 3' d'un ARNt (PBS) et une séquence riche en purines (PU). Ces séquences, situées en aval du 5' LTR et en amont du 3' LTR, sont utilisées respectivement pour amorcer la synthèse du premier et du second brin d'ADN. La deuxième phase du cycle des rétrovirus conduit à la production de particules extracellulaires infectieuses. Le provirus est transcrit par l'ARN polymérase II. Les ARNm sont traduits par la machinerie cellulaire et les polypeptides s'associent pour former des particules immatures qui bourgeonnent hors de la cellule (Figure II.15). Les polypeptides gag et ou gag-pro, ainsi que les polyprotéines gag-pro-pol (Annexe II) sont alors clivés par des protéases ce qui provoque un changement de morphologie des particules virales. Dans ces particules, des molécules d'ARN génomique sont associées à des nucléoprotéines (NC), des protéases, des transcriptases inverses et des intégrases. Ces complexes nucléoprotéiques portent le nom de nucléocapsides, ils sont entourés par une double capsid protéique et par une enveloppe contenant des glycoprotéines (Figure II.15). Ces glycoprotéines sont codées par le gène env et sont produites à partir d'ARNm épissés (Annexe II).

La figure II.14 B montre que les séquences IAP intégrées dans le génome d'une cellule possèdent la même structure que les rétrovirus. Ces séquences codent des protéines qui sont synthétisées à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Ces protéines s'associent et forment des particules qui bourgeonnent dans les citernes du RER (Intracisternal A Particles, ou IAP). Des transcrits produits à partir des séquences IAP sont encapsidés dans ces particules. Ces transcrits peuvent également être convertis en ADN bicaténaire qui s'intègrent dans de nouveaux loci de la cellule. Ce phénomène porte le nom de transposition. Ces différents points sont détaillés dans la discussion (sections III.1 et III.2).

Les séquences IAP ressemblent donc aux rétrovirus par leur structure, leur mode de transcription et de transposition, mais elles produisent des particules intracellulaires.

C. Analyse de l'élément IAP codant l'antigène LEC-A

L'élément IAP codant l'antigène LEC-A a été nommé LEC-A IAP pour le différencier des autres membres de la famille IAP. Sa séquence (4.344 pb) possède 95 % d'identité avec celle de MIA14 (7.095 pb) (Annexe I). MIA14 est un élément IAP complet dont la structure a été décrite (Mietz et al. 1987). La comparaison des éléments MIA14 et LEC-A IAP a permis d'établir que l'élément LEC-A IAP comportait deux

LTR encadrant la séquence PBS, les régions gag, pro et env, ainsi que le segment PU (Figure II.13). La séquence PBS est complémentaire aux 18 nt de l'extrémité 3' de l'ARNtPhe (Keith & Dirheimer 1978). Une délétion de 2.753 pb est responsable de l'absence de la fin de la région pro et de toute la région pol (Annexe I). L'élément LEC-A IAP est entouré par deux courtes répétitions directes (AACAAA). Celles-ci possèdent la taille caractéristique (6 pb) des duplications générées par l'intégration des éléments IAP.

L'alignement des séquences des LTR des éléments LEC-A IAP et MIA14 ainsi que leur structure sont montrés dans la figure II.16. Ces LTR commencent et se terminent par de courtes répétitions inverses (5'TGTT/ACAA3'). Ils peuvent être subdivisés en trois régions: U3, R et U5. La région U3 contient des séquences impliquées dans l'initiation et la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II (Christy & Huang 1988; Galien et al. 1991). L'élément MIA14 possède une "TATA box" canonique (TATAA) située 31 pb en amont de la fin de la région U3. La séquence correspondante de l'élément LEC-A IAP est: GAGAA. Cette "TATA box" atypique semble être meilleure que la "TATA box" canonique. En effet, l'activité promotrice du LTR de l'élément MIA14 est augmentée d'un facteur 3 lorsque sa séquence TATAA est changée en GAGAA (Falzon & Kuff 1990). Le premier nucléotide de la région R (G) est le site d'initiation de la transcription (Lueders et al. 1984). Les deux derniers nucléotides de cette région (CA) correspondent au site de polyadénylation (Christy et al. 1985). Le signal de polyadénylation, AATAAA, est situé 15 pb en amont de ce site. Les séquences des LTR de l'élément LEC-A IAP diffèrent à deux endroits au niveau de la région R.

La plus grande ORF de l'élément LEC-A IAP est localisée dans la région gag du provirus. Elle pourrait coder une protéine de 599 acides aminés que nous avons comparée à la protéine codée par les régions gag et pro de l'élément MIA14 (Figure II.17). Cette dernière comporte un segment N-terminal de 217 acides aminés qui diffère complètement des protéines gag, gag-pro, et gag-pro-pol des autres rétrovirus et trois régions de 224, de 138 et de 248 acides aminés qui présentent respectivement des homologies avec les domaines CA, NC et PR des polyprotéines rétrovirales (Figure II.17) (Mietz et al. 1987). Le segment de la protéine LEC-A situé entre les acides aminés 41 et 564 présente une identité de 93% avec les 532 acides aminés N-terminaux

de la protéine gag-pro de MIA14. Des changements de phase sont responsables de l'extension N-terminale et de la terminaison prématurée de la protéine LEC-A gag.

5.3 Deux transcrits sont produits à partir de l'élément LEC-A IAP

L'élément LEC-A IAP contient plusieurs séquences consensus pour des sites donneurs et accepteurs d'intron (Green 1986). Cet élément pourrait donc produire différents types de transcrits, tout comme les rétrovirus. Le peptide reconnu par les CTL-LEC1:5 pourrait être codé uniquement par un ARNm épissé. Nous avons donc décidé d'identifier et de caractériser les transcrits produits à partir de l'élément LEC-A.

Le génome humain ne contient pas de séquence hybridant avec les éléments IAP murins (Lueders & Kuff 1981). C'est pour cette raison que nous avons transfecté l'élément LEC-A IAP dans une lignée de mélanome humain afin d'étudier facilement sa transcription. Les cellules MZ2-MEL.3.1 ont été transfectées avec 5 µg du fragment BamHI-BamHI de 9 kb cloné dans le vecteur pTZ18R, 10 µg du cosmide k12.1 codant la molécule H-2 D^k (voir II.6.1) et 2 µg du plasmide pRc/RSV contenant le gène de résistance à la néomycine. Les transfectants ont été sélectionnés dans un milieu contenant du G418 et clonés. Un test de lyse visuel effectué sur 147 clones a permis d'identifier 5 clones reconnus par les CTL-LEC1:5. Quatre clones ont été amplifiés et soumis à un test de relargage de chrome-51. Un clone n'a pas été lysé, un clone l'a été faiblement et deux clones ont été bien lysés. La figure II.18 A montre les résultats obtenus pour un de ces deux clones. Un Northern blot a été réalisé avec l'ARN de ce clone et hybridé avec la sonde 1,57 kb Sall-Sall. Des messages de 4,2kb et de 1,4 kb ont été révélés (Figure II.18 B). La taille du plus grand message est compatible avec la distance séparant le début de la région R du 5'LTR et la fin de cette région dans le 3'LTR de l'élément LEC-A IAP (4.073 pb).

Nous avons voulu nous assurer que les cellules LEC produisaient le transcrit de 1,4 kb et analyser la structure de ce transcrit. Des amorces situées en aval du 5'LTR et en amont du 3'LTR de l'élément LEC-A IAP (Figure II.19) ont été utilisées pour amplifier de l'ADNc produit à partir de l'ARN de ces cellules. Un fragment de ~900 pb a été obtenu. Ce fragment a été purifié et cloné dans le vecteur pTZ19R. Parmi les 14 clones recombinants analysés, seul le clone 31 contenait une séquence identique à 100%

à celle de l'élément LEC-A IAP (Figure II.19). Un segment de 2.762 pb correspondant à presque toute la région gag, à la région pro et au début de la région env de l'élément LEC-A IAP est absent du clone 31. Les extrémités de ce segment ressemblent à des sites donneurs et accepteurs d'intron. Un transcrit de 1.311 pb (en ne comptant pas la queue poly-A) pourrait donc être produit à partir de la séquence LEC-A IAP. La taille de ce transcrit est compatible avec la taille de l'ARNm épissé observé dans le transfectant MZ2-MEL exprimant l'antigène LEC-A.

Le clone 31 pourrait coder une protéine différente des protéines codées par des transcrits contenant les régions gag, pro et env de l'élément LEC-A IAP. En effet, il possède une ORF située à cheval sur les deux exons capable de coder un polypeptide de 27 acides aminés (Figure II.20). Nous avons donc transfecté 20 µg d'ADN du clone 31 et 2 µg du cosmide pHMR272 dans les cellules P1.HTR.K^kD^k. Les transfectants ne stimulaient pas la prolifération des CTL-LEC1:5.

6. L'ANTIGENE LEC-A

6.1 Restriction de l'antigène LEC-A

Les CTL reconnaissent leur antigène sous la forme d'un peptide associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Pour identifier la molécule présentant l'antigène LEC-A, nous avons utilisé des cellules P1.HTR exprimant soit K^k, soit D^k (voir II.4.4). Ces cellules ont été transfectées soit avec l'ADN de pHMR272 et avec l'ADN du cosmide P5.C3, soit uniquement avec le marqueur de sélection. Les transfectants résistant à l'hygromycine B ont été soumis à un test de relargage de chrome-51. Les seuls transfectants reconnus par les CTL-LEC1:5 sont ceux qui expriment à la fois la molécule D^k et l'élément LEC-A IAP (Figure II.21).

6.2 Un fragment de 105 pb transfère l'expression de l'antigène

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont permis de montrer que des fragments subgéniques pouvaient transférer l'expression d'antigènes reconnus par des CTL (Chomez et al. 1992). Ce phénomène nous a incité à transfecter plusieurs constructions contenant des régions de plus en plus petites de l'élément LEC-A IAP et à utiliser des tests très sensibles pour analyser l'expression de l'antigène LEC-A par les transfectants.

Les premières transfections ont été réalisées avec l'élément LEC-A IAP délété du côté 5'. Les transfectants ont été analysés par groupes de 20 avec un test de stimulation (Figure II.22 A). 100% des microcultures des cellules transfectées avec l'ADN du clone ExoIII 17b stimulent la prolifération des CTL-LEC1:5. Ce pourcentage chute à 33% et à 4% pour les transfectants obtenus respectivement avec l'ADN du clone ExoIII 19a et du fragment XbaI-XbaI de 3,8 kb cloné dans le plasmide pTZ18R. Le clone ExoIII 1a ne transfère pas l'expression de l'antigène LEC-A. Ces résultats indiquent que la région de l'élément IAP LEC-A située entre le début du fragment XbaI-XbaI de 3,8 kb et le début du clone ExoIII 1a code le peptide reconnu par les CTL-LEC1:5. Ce peptide provient probablement de la protéine gag codée par le provirus (Figure II.13). En effet, la position des codons ATG dans l'ORF codant cette protéine (Figure II.23) permet de comprendre pourquoi le clone ExoIII 19a confère mieux l'expression de l'antigène que le fragment XbaI-XbaI de 3,8 kb. Ceci ne pourrait pas être expliqué si le peptide antigénique était codé par une autre ORF.

D'autres transfections ont été effectuées avec des sous-clones du clone ExoIII 17b qui comportent des délétions affectant la partie 3' de l'élément LEC-A IAP. Les transfectants ont été analysés par groupes de 2.000 avec un test plus rapide et plus sensible que le test de stimulation. Ce test est basé sur la production de facteur de nécrose tumorale (TNF) par les CTL-LEC1:5 au contact de leur antigène. Cette cytokine est détectée et quantifiée par son effet cytolytique sur les cellules WEHI (Traversari et al. 1992). Les transfectants obtenus avec le sous-clone ExoIII 17b/1 stimulent bien la production de TNF par les CTL-LEC1:5, alors que ceux obtenus avec le sous-clone ExoIII 17b/4 le font faiblement (Figure II.22 B). La région du provirus

située la fin du sous-clone ExoIII 17b/4 et la fin du sous-clone ExoIII 17b/1 permet donc une bonne expression de l'antigène (Figure II.23). Cette région contient la séquence PU, le segment U3 et une partie du segment R du 3'LTR du provirus (Figures II.13 et II.16). Ces segments contiennent des séquences impliquées dans la régulation de la transcription des éléments IAP (Christy & Huang 1988; Galien et al. 1991).

Pour localiser avec précision la région codant l'antigène LEC-A, nous avons donc cloné des fragments contenant une partie de l'ORF principale de l'élément LEC-A IAP dans des vecteurs d'expression. Ce type de vecteur a été choisi afin d'obtenir une bonne transcription des fragments même en l'absence des LTR de l'élément LEC-A IAP. Les transfectants obtenus avec les fragments EcoRI-EcoRI de 0,47 kb et XbaI-XbaI de 3,8 kb clonés dans le plasmide pSVK3 stimulent bien la production de TNF par les CTL-LEC1:5 (Figures II.22 C et II.23). Le fragment XbaI-EcoRI de 268 pb confère aussi l'expression de l'antigène LEC-A (Figures II.22 C et II.23). Ce fragment a été utilisé pour générer par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) trois fragments de 105, 120 et 108 pb correspondant respectivement aux codons 70-102, 91-128 et 121-154 de l'ORF de l'élément LEC-A IAP codant la protéine gag. Chaque fragment contient un codon ATG en 5' et un codon STOP en 3'. Ces fragments ont été clonés dans le plasmide pSVK6.4 et transfectés. Seul le fragment de 105 pb transfère l'expression de l'antigène LEC-A (Figure II.22 C et II.23).

6.3 Identification de peptides reconnus par les CTL-LEC1:5

Le fragment de 105 pb code un polypeptide de 34 acides aminés (Figure II.24). Le premier acide aminé est une méthionine introduite par PCR. Les 12 acides aminés du côté C-terminal sont aussi codés par le fragment de 120 pb qui ne confère pas l'expression de l'antigène. En admettant que le peptide antigénique est un décimère, ceci réduit la région codant ce peptide à 30 codons. Quatre peptides couvrant cette région ont été synthétisés. Ces peptides ont été incubés à différentes concentrations avec des cellules P1.HTR.K^kD^k cl1b marquées au chrome-51. Des CTL-LEC1:5 ont été ajoutés à un rapport effecteur/cible de 10/1. La figure II.25 A montre que le peptide de 14 acides aminés gag.86-99 qui comprend les acides aminés 86 à 99 de l'ORF principale de l'élément LEC-A IAP est reconnu par les CTL-LEC1:5. Des peptides plus petits ont été synthétisés et testés. Le décimère gag.88-97 et le nonamère gag.88-96 induisent la

lyse des cellules P1.HTR.K^{kD} cl.1b par les CTL-LEC1:5. Les peptides gag.86-95 et gag.89-98 ne sont pas reconnus par les CTL-LEC1:5 (Figure II.25 B). Ceci montre que l'arginine située du côté N-terminal et la leucine située du côté C-terminal du peptide gag.88-96 (RRKGKYTGL) sont indispensables.

7. TRANSPOSITION DE L'ELEMENT LEC-A IAP DANS LEC

7.1 Mise en évidence de la transposition

Pour comprendre le mécanisme responsable de l'expression de l'antigène LEC-A, nous avons comparé l'ADN génomique des cellules LEC, l'ADN de deux leucémies syngéniques non reconnues par les CTL-LEC1:5 et l'ADN de reins de souris CBA/Ht. Etant donné que le génome de *Mus musculus* comporte environ 2.000 séquences IAP (Lueders & Kuff 1977), il fallait utiliser les séquences situées à proximité de l'élément LEC-A IAP pour mettre en évidence cet élément.

L'ADN des différentes cellules a été digéré par l'enzyme BamHI qui n'a pas de site de reconnaissance dans l'élément LEC-A IAP (Figure II.12). Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose, dénaturés et transférés sur une feuille de nitrocellulose. Ce filtre a été hybridé avec une sonde marquée au phosphore-32. Un fragment HindIII-EcoRI situé en amont de l'élément LEC-A IAP (Figure II.12) a été choisi, car il ne contient pas de séquences répétitives. La membrane a ensuite été lavée et autoradiographiée. Des bandes d'environ 6 kb et 10,5 kb sont visibles dans les cellules LEC.aza^R et dans les cellules LEC1 (Figure II.26 A). Les tumeurs LEB et TH ainsi que les cellules normales ne possèdent que la bande à 6 kb (Figure II.26 A). Ces résultats suggèrent que c'est la bande de 10,5 kb qui est responsable de l'expression de l'antigène LEC-A par les cellules LEC. De plus, la différence de taille entre les deux bandes observées dans les cellules LEC est compatible avec l'insertion de l'élément LEC-A IAP (4.344 pb) dans un fragment BamHI de 6 kb.

Des PCR ont permis de confirmer la transposition de la séquence LEC-A IAP dans la tumeur LEC. En effet, des réactions effectuées avec un oligonucléotide

correspondant à une séquence située en amont de l'élément LEC-A IAP et un oligonucléotide complémentaire d'une séquence située au début de la région gag de cet élément (Figure II.13) ont permis d'amplifier un fragment de 805 pb uniquement avec l'ADN génomique des cellules LEC (Figure II.26 B). De même, des PCR réalisées avec un oligonucléotide complémentaire d'une séquence située à la fin de la région pro de l'élément LEC-A IAP et un oligonucléotide correspondant à une séquence située en aval de cet élément (Figure II.13) ont permis d'obtenir un fragment de 1.678 pb uniquement avec l'ADN des cellules LEC (Figure II.26 B). Lorsque les amplifications sont réalisées avec les oligonucléotides correspondant à des séquences situées en amont et en aval du provirus, des fragments de 146 pb sont amplifiés avec l'ADN de toutes les cellules (Figure II.26 C). La séquence des fragments obtenus avec l'ADN des cellules LEC a été déterminée. La seule différence entre cette séquence et les séquences jouxtant l'élément LEC-A IAP est la duplication de six nucléotides (AACAAA) générée par l'intégration du rétrovirus endogène défectif (Figure II.26 D).

Ces résultats montrent que les cellules LEC sont hétérozygotes pour le locus défini par le fragment HindIII-EcoRI que nous avons utilisé comme sonde. Ces cellules contiennent un allèle "normal" et un allèle "muté" qui comporte un élément IAP codant l'antigène LEC-A. Les autres cellules ne possèdent que l'allèle "normal".

7.2 Importance de la transposition pour l'expression de l'antigène

Pour déterminer si la transposition de l'élément LEC-A IAP était responsable de l'expression de l'antigène LEC-A par les cellules LEC, nous avons décidé de comparer l'ADN de ces cellules avec l'ADN de variants n'exprimant plus cet antigène. Ces variants ont été obtenus en cultivant des cellules LEC avec des CTL-LEC1:5 pendant 24 heures. Trois "immunosélections" ont été réalisées avec des rapports cellules effectrices/cellules cibles variant de ~1,6/1 à ~3,4/1. Les cellules survivantes ont été amplifiées et clonées. Les clones ont été soumis à un test de relargage de chrome-51 pour évaluer leur sensibilité à la lyse par les CTL-1D:16 et par les CTL-LEC1:5. La figure II.27 montre les résultats obtenus avec un clone provenant de chaque immunosélection. Les trois clones expriment toujours la molécule D^k, mais ne sont plus reconnus par les CTL-LEC1:5. Un Southern blot préparé avec l'ADN de ces clones a montré qu'ils avaient perdu le fragment BamHI de 10,5 kb hybridant avec la sonde

HindIII-EcoRI située en amont de l'élément LEC-A IAP transposé. Le fragment BamHI de 6 kb allumé par cette sonde est toujours présent. Des réactions PCR réalisées avec l'ADN de ces clones et les paires d'oligonucléotides complémentaires des séquences situées de chaque côté des deux sites d'intégration de l'élément LEC-A IAP sont négatives. Les réactions effectuées avec une paire d'oligonucléotides correspondant aux séquences situées en amont et en aval de l'élément LEC-A IAP permettent d'amplifier des fragments de 146 pb.

Ces résultats indiquent que le chromosome des cellules LEC portant l'allèle "muté" a subi une délétion dans les trois variants qui n'expriment plus l'antigène LEC-A. Cette délétion a éliminé la région codant le peptide antigénique.

7.3 Le génome de LEC contient plusieurs loci susceptibles de coder l'antigène LEC-A

L'ADN des cellules P1.HTR.K^{kD}, des quatre transfectants génomiques et des six transfectants cosmidiques exprimant l'antigène LEC-A a été analysé par Southern blot. Seuls trois transfectants génomiques et le transfectant cosmidique P1.LEC.TC36.1 contiennent des séquences complémentaires au fragment HindIII-EcoRI situé en amont de l'élément LEC-A IAP transposé (Figure II.28). Ces résultats suggèrent que le transfectant génomique P1.LEC.T4 et que cinq transfectants cosmidiques ne contenaient pas l'élément LEC-A IAP. Les ADN de ces transfectants ont été utilisés pour effectuer des réactions PCR avec les paires d'oligonucléotides complémentaires des séquences situées de chaque côté des deux sites d'intégration de l'élément LEC-A IAP. Des fragments de 1.678 pb et 805 pb ont été amplifiés uniquement avec l'ADN du transfectants P1.LEC.T4. Des réactions PCR réalisées avec des oligonucléotides permettant l'amplification de l'exon 2 du gène P1A (Lethé et al. 1992) ont montré que l'ADN des autres transfectants n'était pas dégradé. Ces oligonucléotides ont été choisis car les oligonucléotides complémentaires des séquences situées en amont et en aval de l'élément LEC-A IAP ne permettent pas d'amplifier le fragment de 146 pb avec l'ADN des cellules P1.HTR.K^{kD}. Ces résultats impliquent que le génome des cellules LEC comporte au moins un autre locus capable de conférer l'expression de l'antigène LEC-A par transfection.

Nous avons voulu comprendre pourquoi la sonde HindIII-EcoRI et les oligonucléotides complémentaires des séquences situées en amont et en aval de l'élément LEC-A IAP n'hybridaient pas avec l'ADN des cellules P1.HTR.K^kD^k. Ces cellules ont été obtenues en transfectant les gènes H-2 K^k et H-2 D^k dans les cellules hautement transfectables P1.HTR. Ces cellules dérivent du clone P1 qui provient du mastocytome P815. Cette tumeur a été isolée dans une souris DBA/2 (H-2^d). C'est pour ces raisons que nous avons effectué un Southern blot avec l'ADN des cellules de reins de souris DBA/2 et l'ADN du clone P1. La sonde HindIII-EcoRI allume un fragment BamHI de 6 kb dans ces cellules. Les séquences flanquant l'élément LEC-A IAP ont probablement été perdues au cours de l'obtention des cellules P1.HTR. En effet, ceci a été réalisé en soumettant les cellules P1 à plusieurs cycles de sélection de variants tk⁻ et de transfection du gène tk (Van Pel et al. 1985). Il est raisonnable de penser que des délétions se sont produites au cours des sélections des variants tk⁻.

8. EXPRESSION DE L'ANTIGENE LEC-A

Des séquences IAP sont abondamment transcrites et traduites dans de nombreuses lignées de cellules tumorales et fibroblastiques (Kuff & Lueders 1988). C'est pour cette raison que nous avons étudié l'expression de l'antigène LEC-A par différentes lignées cellulaires. Ceci ne peut pas être réalisé par une approche génétique car le gène codant cet antigène appartient à une famille comportant environ 2.000 membres très apparentés. Plusieurs séquences IAP différentes pourraient donc produire le peptide reconnu par les CTL-LEC1:5. La dégénérescence du code génétique implique que ces éléments puissent différer au niveau de la région codant le peptide antigénique reconnu par les CTL-LEC1:5. Il est donc difficile, voire même impossible, de détecter tous les ARNm codant l'antigène LEC-A.

Le test de production de TNF a donc été utilisé pour analyser l'expression de l'antigène LEC-A par des lignées cellulaires provenant de souris d'haplotype H-2^k. La figure II.29 A montre que les CTL-LEC1:5 ne reconnaissent pas les 12 lignées que nous avons testées. Ceci peut s'expliquer de deux façons: les cellules ne produisent pas le peptide reconnu par les CTL-LEC1:5, ou elles n'expriment pas la molécule D^k présentant ce peptide. Un test TNF réalisé sur les même cellules préalablement

incubées avec le peptide gag.88-96 a permis de montrer qu'elles sont reconnues par le CTL ce qui implique la présence de molécules D^k à leur surface (Figure II.29 B). Les résultats obtenus avec les cellules K1735, NT, MCA15 et 16 suggèrent que ces cellules expriment moins de molécules D^k que les autres. Les cellules C3H/10T1/2 n'ont pas été testées. Etant donné que l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe I peut être augmentée par du surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires, nous avons décidé de cultiver ces cellules pendant trois jours dans un milieu contenant 25% de ce surnageant. Ce traitement ne modifie pas significativement la reconnaissance de ces cellules par les CTL-LEC1:5 (Figure II.29A). La préincubation de ces cellules avec le peptide gag.88-96 montre cependant que la production de TNF peut être augmentée (Figure II.29 B).

III. DISCUSSION

Au cours de cette thèse, nous avons isolé la séquence codant l'antigène LEC-A reconnu par les CTL-LEC1:5 sur la leucémie murine spontanée LEC. Nous avons appelé cette séquence LEC-A IAP, car elle présente une homologie très importante avec les rétrovirus endogènes défectifs appartenant à la famille IAP. L'élément LEC-A IAP a subi une transposition dans les cellules LEC. La transposition est responsable de l'expression de l'antigène LEC-A par les cellules LEC. Cet antigène est codé par la région gag de l'élément LEC-A IAP et est reconnu par les CTL-LEC1:5 en association avec la molécule H-2 D^k (de Bergeyck et al. 1994).

1. LA SEQUENCE CODANT L'ANTIGENE LEC-A APPARTIENT A LA FAMILLE IAP

La séquence codant l'antigène LEC-A est un rétrovirus endogène défectif appartenant à la famille IAP. Des membres de cette famille codent des protéines qui sont synthétisées à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Ces protéines s'assemblent et forment des structures qui ressemblent à des particules rétrovirales immatures. Les paragraphes suivants décrivent les caractéristiques de ces particules, de leurs constituants et des séquences qui sont responsables de leur synthèse.

1.1 Particules intraciternales de type A

La microscopie électronique a permis de mettre en évidence des structures annulaires d'un diamètre de ~80 nm qui bourgeonnent dans la lumière du RER des oocytes, des embryons avant implantation et des cellules tumorales de souris. Les citernes du RER des tissus normaux n'en contiennent presque pas. Ces structures sont constituées de deux couches denses aux électrons entourant une région centrale claire.

Elles ressemblent à des particules rétrovirales immatures dites de type A. C'est pour ces raisons qu'elles sont appelées particules intraciternales de type A ou IAP (Intracisternal A Particles).

Les cellules de myélomes provenant de souris BALB/c et du neuroblastome C1300 obtenu dans une souris A/J comportent chacune jusqu'à 10.000 IAP. Les IAP ont été isolées à partir de ces tumeurs. Ces particules contiennent 14% de phospholipides, 80% de protéines et 5-6% d'ARN. Les phospholipides sont issus de la membrane du RER et forment la couche externe de la particule virale. La couche interne (capside) est constituée de protéines associées par des ponts disulfures. La majorité de ces protéines ont un poids moléculaire de 73 kDaltons et sont appelées p73 (Kuff et al. 1972). Des protéines de la capsidie ont une activité de transcriptase inverse (Wilson & Kuff 1972; Wilson et al. 1974).

1.2 Séquences IAP

Le génome des souris *Mus musculus* contient près de 2.000 séquences dispersées sur tous les chromosomes qui hybrident avec l'ARN extrait des IAP (Lueders & Kuff 1977; Kuff et al. 1986). Environ 1.400 séquences "IAP" ont une taille de 7,1 kb, les autres sont plus petites (Lueders & Kuff 1980; Kuff & Lueders 1988). Plusieurs éléments de 7,1 kb ont été isolés. Ils sont homologues, mais pas identiques. En effet, ils forment des hétéroduplex continus, mais ne présentent pas exactement les mêmes cartes de restriction (Lueders & Kuff 1980). La séquence d'un élément, le MIA14, a été déterminée et comparée aux séquences du virus du sarcome de Rous (RSV) et d'un rétrovirus simien (SRV-1) (Mietz et al. 1987). Ceci a permis d'établir que les éléments IAP de 7,1 kb possèdent la même structure que les rétrovirus: deux LTR encadrant les régions gag, pro, pol et env. Les éléments IAP plus courts sont délétés. Ils sont classés en fonction de la taille et de la localisation de leur(s) délétion(s) (Figure III.1). La séquence LEC-A IAP appartient à la classe $\Delta 3$. L'élément L31 fait aussi partie de cette classe (Aota et al. 1987). Ces deux éléments portent quasiment la même délétion couvrant la fin de la région pro et toute la région pol (Annexe I).

Le génome d'autres muridés, tels que les hamsters et les rats, contient aussi des séquences hybridant avec les éléments IAP (Lueders & Kuff 1981).

1.3 Protéines codées par les séquences IAP

Les régions gag et pro de l'élément MIA14 pourrait coder une protéine de 827 acides aminés. Le poids moléculaire de cette protéine, ~93 kDaltons, est nettement supérieur à celui de la majorité des constituants des capsides des IAP. Cependant, des expériences effectuées *in vitro* ont montré que des protéines de 73 kDaltons sont synthétisées à partir des régions gag et pro d'un élément IAP capable de coder un polypeptide de ~90 kDaltons (Mietz et al. 1987). La fin de la région pro de l'élément MIA14 contient une séquence de sept nucléotides (GGGTTTT, Annexe I) qui pourrait être le site d'un changement de phase (-1) au cours de la traduction. Ce mécanisme est responsable de la production des polyprotéines gag-pro et ou gag-pro-pol par plusieurs rétrovirus (Jacks et al. 1988). L'élément MIA14 ne contient pas d'ORF permettant de coder un précurseur gag-pro-pol complet. La séquence de cet élément a été comparée aux séquences d'autres éléments IAP murins. Ceci a permis d'établir que certains éléments IAP devraient coder des protéines gag-pro-pol d'environ 1.700 acides aminés (Mietz et al. 1987). Des polypeptides de 180-190 kDaltons réagissant avec des anticorps dirigés contre les protéines p73 ont été mis en évidence dans des tumeurs exprimant des séquences IAP de 7,1 kb (Kuff & Fewell 1985). La région env de l'élément MIA14 contient 76 codons stop dans les trois phases de lecture. La grande majorité de ces codons sont présents dans les autres séquences IAP analysées. Ceci expliquerait que des protéines d'enveloppe spécifiques des IAP n'ont jamais été mises en évidence (Mietz et al. 1987).

L'analyse de la protéine gag-pro de l'élément MIA14 permet d'imaginer le mécanisme responsable de la localisation typique des IAP (Figure III.2). Cette protéine comporte successivement i) un segment hydrophobe qui ressemble à un peptide signal, mais qui n'en possède pas toutes les caractéristiques (von Heijne 1990); ii) une région hydrophile qui contient de nombreux résidus chargés et des cystéines; iii) une partie qui présente des homologues avec les protéines gag-pro et ou gag-pro-pol des rétrovirus (Figure II.17). Au cours de la synthèse de cette protéine, une particule de reconnaissance du signal se lierait au segment hydrophobe. Cette liaison inhibe la poursuite de la traduction jusqu'au moment où la particule de reconnaissance du signal se lie à son récepteur qui est situé dans la membrane du RER. Le peptide signal est

alors transféré dans la membrane du RER et la synthèse protéique reprend (Rapoport 1991). Les résidus chargés et les cystéines de la chaîne peptidique naissante permettraient aux protéines gag-pro synthétisées à la surface du RER de s'associer et de former des particules qui bourgeonnent dans la lumière du RER (Mietz et al. 1987). La protéine gag codée par l'élément LEC-A IAP ne possède pas tout à fait la même structure que la protéine gag-pro de l'élément MIA14, car elle comporte une extension N-terminale de 40 acides aminés (Figure II.17). Cette protéine pourrait cependant participer à la formation des IAP. En effet, il existe des protéines transmembranaires qui contiennent une région hydrophobe, mais pas de séquence signal. L'extrémité C-terminale d'une partie de ces protéines est située dans le cytosol (Haeuptle et al. 1989).

Des expériences d'immunocytochimie effectuées avec des anticorps dirigés contre les protéines p73 confirment cette hypothèse. En effet, ces anticorps reconnaissent des protéines qui s'assemblent sur les membranes du RER des cellules. Les IAP sont faiblement marquées. Ceci signifie que les épitopes reconnus par ces anticorps deviennent inaccessibles lorsque les particules se forment. Ces épitopes ne sont pas détectés dans le cytoplasme des cellules (Leiter & Kuff 1984).

2. L'ELEMENT LEC-A IAP A SUBI UNE TRANSPOSITION DANS LES CELLULES LEC

Pour comprendre le mécanisme responsable de l'expression de l'antigène LEC-A, l'ADN des cellules LEC a été comparé aux ADN de deux leucémies syngéniques qui ne sont pas reconnues par les CTL-LEC1:5 et à l'ADN de cellules syngéniques normales. Ceci a permis de montrer que l'élément LEC-A IAP a subi une transposition dans les cellules LEC. La comparaison de l'ADN des cellules LEC et de l'ADN de trois variants de ces cellules qui ne sont plus reconnus par les CTL-LEC 1:5 a révélé que l'élément transposé est responsable de l'expression de l'antigène LEC-A. De plus, cette transposition pourrait être impliquée dans la formation de la tumeur LEC.

2.1. Transposition de l'élément LEC-A IAP et expression de l'antigène

Les travaux d'Odile et Thierry Heidmann (Heidmann & Heidmann 1991) ont permis de montrer que les éléments IAP se transposent de la même façon que les rétrovirus. La transposition s'effectue en deux étapes: un ARNm est converti par transcription inverse en une copie d'ADN bicaténaire qui est ensuite intégrée dans un nouveau locus génomique. L'analyse des éléments transposés révèle qu'ils ont subi des mutations. La plupart de celles-ci sont localisées dans les LTR. Ces mutations sont probablement générées au cours de la transcription inverse.

Deux mécanismes pourraient être responsables de l'expression de l'antigène LEC-A par les cellules LEC (Figure III.3). Des mutations générées au cours de la transposition d'élément IAP pourraient modifier soit la séquence des ORF de ces éléments, soit la longueur de ces ORF. Des mutations ponctuelles provoquant un changement d'acide aminé peuvent causer de l'apparition de peptides antigéniques reconnus par des CTL (Figure I.7) (Lurquin et al. 1989; Sibille et al. 1990; Szikora et al. 1990). Des protéines plus longues pourraient contenir des peptides antigéniques supplémentaires. Des éléments IAP codant les peptides reconnus par les CTL-LEC1:5 pourraient donc être générés à partir de séquences IAP incapables de coder ces peptides. L'activation de gènes silencieux peut aussi causer l'apparition de peptides antigéniques reconnus par des CTL (Figure I.7). Ce mécanisme est responsable de l'expression des antigènes P815A et B à la surface du mastocytome P815 (Van den Eynde et al. 1991), ainsi que des antigènes MAGE-1.A1, MAGE-1.Cw*1601 et MAGE-3.A1 par des tumeurs humaines (van der Bruggen et al. 1991; van der Bruggen et al. 1994; Gaugler et al. 1994). Des tumeurs qui expriment la molécule d'histocompatibilité de classe I HLA-A1 et qui transcrivent faiblement le gène MAGE-1 ne sont pas reconnues par des CTL anti-MAGE-1.A1 (Weynants et al. 1994). Ceci implique que des cellules pourraient transcrire faiblement des séquences IAP codant l'antigène LEC-A et ne pas être reconnues par les CTL-LEC1:5. La transposition de ces éléments pourrait augmenter leur transcription en générant des mutations dans leurs LTR et ou en permettant leur insertion dans une région du génome activement transcrite.

L'analyse de l'ADN génomique des transfectants cosmidiques reconnus par les CTL-LEC1:5 montre clairement que seul le transfectant P1.LEC.TC36.1 contient l'élément LEC-A IAP qui a subi une transposition dans les cellules LEC. Le génome

des cellules LEC comporte donc d'autres séquences capables de coder le peptide antigénique reconnu par les CTL-LEC1:5. Ces séquences sont probablement peu transcrites dans les cellules LEC, mais elles sont activées dans les transfectants cosmidiqes. Ces résultats suggèrent que le peptide antigénique résulte d'une activation transcriptionnelle, plutôt que de mutations provoquant la production de nouveaux peptides antigéniques.

2.2 Transposition d'éléments IAP et mutagenèse associée

Certaines transpositions modifient les caractéristiques des cellules. Par exemple, l'insertion de séquences IAP dans les introns du gène kappa d'un hybridome sécrétant des IgM anti-TNP génère des variants ne synthétisant pas ou peu d'immunoglobulines (Hawley et al. 1984). D'autre part, des tumeurs peuvent produire de l'IL-3 (Ymer et al. 1985), de l'IL-5 (Tohyama et al. 1990), de l'IL-6 (Blankenstein et al. 1990), ou du GM-CSF (Dührsen et al. 1990; Heberlein et al. 1990; Leslie et al. 1991) de façon constitutive suite à l'intégration d'éléments IAP à proximité des gènes codant ces interleukines. La transposition d'éléments IAP a aussi provoqué l'activation des gènes codant la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (Kono et al. 1990), ou le récepteur de l'IL-6 (Sugita et al. 1990), de l'oncogène c-mos (Rechavi et al. 1982), du gène de la résistance multidrogue *mdr3* (Lepage et al. 1993), ou du gène homéotique *Hox2.4* (Kongsuwan et al. 1989).

Deux transpositions mises en évidence dans la leucémie myéломonoocytaire WEHI-3B sont responsables de l'activation du gène de l'IL-3 et de l'homéogène *Hox2.4* (Ymer et al. 1985; Kongsuwan et al. 1989). Ces transpositions sont probablement responsables de l'apparition de cette tumeur. En effet, des cellules de moelle osseuse infectées à la fois avec des rétrovirus contenant l'ADNc de l'IL-3 et des rétrovirus portant l'ADNc du gène homéotique *Hox2.4* provoquent des leucémies foudroyantes lorsqu'elles sont injectées dans des souris syngéniques (Perkins et al. 1990). Par contre, des cellules de moelle osseuse infectées avec des rétrovirus contenant soit l'ADNc de l'IL-3, soit l'ADNc de l'homéogène *Hox2.4* ne sont pas tumorigènes (Chang et al. 1989; Perkins & Cory 1993). Il existe d'autres exemples où les transpositions d'éléments IAP sont impliquées dans la transformation tumorale (Nair et al. 1989; Hirsch et al. 1993). Les séquences IAP jouent probablement un rôle plus important dans la progression

tumorale que dans la transformation tumorale, car elles sont transcrites plus activement dans les tumeurs que dans les tissus normaux (Kuff & Fewell 1985; Asch et al. 1993).

Pour déterminer si la transposition de l'élément LEC-A IAP a participé la formation de la tumeur LEC, il faudrait donc étudier les séquences situées en amont et en aval de cet élément.

3. L'EXPRESSION DE L'ANTIGENE LEC-A EST UN EVENEMENT RARE

3.1 Identification du peptide antigénique

Les CTL-LEC1:5 reconnaissent de façon similaire le décapeptide gag.88-97 (RRKGKYTGSL) et le nonapeptide gag.88-96 (RRKGKYTGL) qui sont situés dans la partie hydrophile de la protéine gag de l'élément LEC-A IAP. L'arginine N-terminale et la leucine C-terminale du nonamère sont nécessaires pour que ce peptide soit reconnu par les CTL. Etant donné que la majorité des peptides élués des molécules d'histocompatibilité de classe I comportent 8 ou 9 acides aminés (Falk et al. 1991), le nonamère correspond probablement au peptide présent à la surface des cellules LEC. Ce peptide est reconnu par les CTL-LEC1:5 en association avec la molécule H-2 D^k. C'est la première fois qu'un peptide présenté par cette molécule est identifié.

3.2. Recherche de séquences codant le peptide antigénique

Des séquences IAP sont abondamment transcrites et traduites dans de nombreuses lignées de cellules tumorales et fibroblastiques (Kuff & Lueders 1988), plusieurs lignées cellulaires pourraient donc être reconnues par les CTL-LEC1:5. L'analyse de 13 lignées de l'haplotype H-2^k indique cependant que c'est un événement rare. De plus, les banques de données GenBank (release 84, août 1994) et EMBL (release 39, juin 1994) ne contiennent pas de séquences capables de coder les peptides reconnus par les CTL-LEC1:5. De même, les protéines dont les séquences ont été

soumises aux banques de données SWISS-PROT (release 29, juin 1994) et PIR (release 41, juin 1994) ne contiennent pas ces peptides.

4. PERSPECTIVES

Le clonage de gènes codant des antigènes tumoraux reconnus par des CTL et l'identification des peptides antigéniques reconnus par ces CTL ouvrent de nouvelles perspectives pour l'immunothérapie du cancer. En effet, l'obtention de clones CTL spécifiques de tumeurs permet de réaliser des transferts adoptifs. Tandis que la caractérisation des antigènes reconnus par ces CTL permet d'envisager une stratégie d'immunisation active.

4.1 Stratégies d'immunisation active

La caractérisation d'antigènes tumoraux permet d'imaginer différents modes d'immunisation. Le premier consiste à augmenter l'immunogénicité des cellules exprimant l'antigène. Ceci peut être réalisé en modifiant leur surface avec des substances chimiques telles que le trinitrophényl (Galili et al. 1976), en produisant des hybrides somatiques entre ces cellules et des cellules allogéniques (Kim 1979), en les traitant avec des agents mutagènes (Van Pel et al. 1983), ou en les transfectant avec des gènes qui codent pour des cytokines (Fearon et al. 1990; Dranoff et al. 1993), pour l'interféron- γ (Restifo et al. 1992), ou pour la molécule costimulatrice B7 (Chen et al. 1994). Une deuxième voie serait d'introduire les gènes codant les antigènes tumoraux ou des "minigènes" codant les peptides antigéniques dans des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, comme les macrophages ou les cellules dendritiques. Ces cellules pourraient aussi être pulsées avec les peptides antigéniques. Une troisième possibilité serait d'injecter directement des bactéries ou des virus manipulés génétiquement pour coder les antigènes. Un quatrième mode d'immunisation serait l'injection des protéines ou des peptides antigéniques purifiés.

Ces différents modes d'immunisation sont actuellement testés dans notre laboratoire pour voir s'ils sont capables d'induire une réponse contre l'antigène P815 A:

un antigène exprimé par plusieurs mastocytomes murins (Van den Eynde et al. 1991). La première étape consiste à voir si les souris traitées contiennent des CTL dirigés contre cet antigène. La deuxième phase serait d'injecter des cellules tumorales dans ces souris pour déterminer si elles sont protégées. Dans ce cas, il faudrait analyser les souris pour s'assurer qu'elles ne développent pas de réponses autoimmunitaires. L'antigène P815 A est en effet exprimé dans le testicule et dans le placenta (Van den Eynde et al., en préparation).

4.2 Identification de gènes codant des antigènes reconnus par des CTL à la surface de tumeurs humaines

Des clones CTL reconnaissant des antigènes à la surface de tumeurs humaines ont été obtenus en restimulant *in vitro* des lymphocytes du sang périphérique de patients cancéreux avec des cellules tumorales de ces patients. Les antigènes reconnus par plusieurs clones CTL ont été caractérisés. Certains résultent de l'activation transcriptionnelle d'un gène. C'est le cas des antigènes codés par les gènes MAGE-1 et MAGE-3 (van der Bruggen et al. 1991; van der Bruggen et al. 1994; Gaugler et al. 1994). Ces gènes sont exprimés dans des mélanomes, dans des tumeurs du sein et dans des tumeurs du poumon. Il sont silencieux dans les tissus normaux à l'exception du testicule et du placenta. D'autres antigènes dérivent de protéines codées par des gènes de différenciation tels le gène codant la tyrosinase (Brichard et al. 1993), le gène codant la protéine gp100 (Cox et al. 1994) et le gène Melan-A (Coulie et al. 1994). Ces gènes sont exprimés par des mélanocytes et par des mélanomes, mais pas par des tumeurs d'autres types histologiques.

Certains antigènes reconnus par des CTL à la surface de tumeurs humaines pourraient être codés par des rétrovirus endogènes. En effet, des séquences présentant des analogies avec les rétrovirus constituent de 0,1 à 0,6 % du génome humain. Ces séquences sont classées en familles qui comportent de 1 à 1.000 membres par génome haploïde. Des transcrits correspondant à ces séquences sont présents principalement dans le placenta et dans différentes tumeurs. Des anticorps dirigés contre des protéines rétrovirales reconnaissent des antigènes dans de nombreuses cellules. Une activité de transcriptase inverse a été mise en évidence dans différents types de tumeurs et dans le

placenta. Des particules de type rétroviral sont observées dans le placenta et dans des lignées de tératocarcinomes (Leib-Mösch et al. 1990).

IV. MATERIEL ET METHODES

IV.I BIOLOGIE CELLULAIRE

1. CELLULES

1.1 P1.HTR.tk⁻ et P1.HTR.K^kD^k

Les cellules P1.HTR.tk⁻ et P1.HTR.K^kD^k dérivent du mastocytome P815, une tumeur solide obtenue dans une souris DBA/2 (H-2^d) soumise à des applications cutanées répétées de méthylcholanthrène (Dunn & Potter 1957). L'implantation intrapéritonéale d'un fragment de cette tumeur dans des souris syngéniques a permis de développer la forme ascitique du mastocytome. Au cours des transferts successifs de la tumeur *in vivo*, deux lignées adaptées à la culture *in vitro* ont été dérivées. Le clone P1 a été isolé à partir de la lignée P815-X2 (Uyttenhove et al. 1980). Le sous-clone P1.tk⁻ est résistant à la bromodéoxyuridine (BrdU). Les cellules P1.tk⁻ ont une fréquence de transfection inférieure à 10⁻⁶. Les cellules P1.HTR.tk⁻ possèdent une fréquence de transfection de ~10⁻⁴: elles ont été obtenues en soumettant les cellules P1.tk⁻ à 4 cycles successifs de transfection du gène tk, de sélection des transfectants tk⁺ dans du milieu contenant du HAT et d'obtention de révertants tk⁻ dans du milieu contenant du BrdU (Van Pel et al. 1985). Les cellules P1.HTR.K^kD^k expriment les molécules de classe I de l'haplotype k: elles ont été obtenues en cotransfectant les gènes H-2 K^k et H-2 D^k des souris AKR (Arnold et al. 1984; Stephan et al. 1986) et le plasmide pSVtknéoβ (Nicolas & Berg 1983) dans les cellules P1.HTR.tk⁻.

1.2 LEA, LEB et LEC

Les leucémies spontanées LEA, LEB et LEC ont été isolées dans des souris CBA/Ht (H-2^k) par H. Hewitt. L'injection de ces tumeurs dans la cavité péritonéale de souris syngéniques ne provoque pas d'ascite. Les animaux inoculés présentent principalement des métastases au niveau de la rate et du foie, les ganglions

lymphatiques sont moins affectés. Pour maintenir ces tumeurs *in vivo*, des cellules isolées à partir du foie de ces animaux sont injectées dans la cavité péritonéale de souris syngéniques.

Les tumeurs LEA, LEB et LEC ont été adaptées à la culture *in vitro* après respectivement ~129, 340 et 205 transferts effectués *in vivo*. Les clones LEA1, LEB1 et LEC1 ont été isolés à partir de ces lignées cellulaires (Van Pel et al. 1983). Les cellules LEB1 expriment l'antigène Thy1.2 indiquant qu'elles proviennent d'un lymphocyte T. Les cellules LEC1 dérivent d'un lymphocyte B car elles ont des IgM membranaires. Les cellules LEA1 ne présentent pas le marqueur Thy1, ni d'IgM à leur surface.

Le sous-clone LEC.aza^R a été obtenu en cultivant les cellules LEC1 dans un milieu contenant de l'azaguanine à une concentration de 10 µg/ml.

1.3 TH1821

Ces cellules dérivent de la tumeur TH, une leucémie thymique isolée par H. Hewitt dans une souris CBA/Ht qui avait été exposée à 1.800 rads de rayons γ. Le variant tum^r TH1821 a été obtenu après traitement mutagène des cellules TH1, une lignée cellulaire clonale adaptée à la culture *in vitro* (Van Pel & Boon 1982). Ces cellules expriment l'antigène Thy1.2.

1.4 C1.18.4

C1.18.4 (ATCC TIB 11) est une lignée clonale qui dérive du myélome X-5563 apparu spontanément dans une souris C3H (H-2^k). Ces cellules sécrètent des IgG2a (γ2a, κ) de spécificité inconnue et n'ont pas d'immunoglobuline membranaire.

1.5 BW5147

Les cellules BW5147.G.1.4 (ATCC TIB 48) proviennent d'un lymphome thymique apparu spontanément dans une souris AKR/J (H-2^k). Ces cellules sont hgp^rt⁻.

1.6 NT

L'adénocarcinome spontané NT a été isolé par H. Hewitt dans une souris CBA/Ht (Hewitt et al. 1976). Une lignée cellulaire adaptée à la culture *in vitro* a été obtenue dans notre laboratoire par A. Van Pel.

1.7 K1735

Le mélanome K1735 a été induit aux ultraviolets dans une souris C3H. Nous l'avons reçu de Margaret Kripke (University of Texas MD, Anderson Cancer Research).

1.8 L929, cl1D003 et DAP

Le clone L929 (ATCC CCL 1) dérive de la lignée L établie au départ de fibroblastes d'une souris C3H (Sanford et al. 1948). Les cellules L-M proviennent du clone L929, elles sont capables de proliférer dans un milieu ne contenant pas de sérum (Hsu & Merchant 1961). Les cellules cl1D tk⁻ ont été obtenues en cultivant les cellules L-M dans du milieu contenant du BrdU à une concentration de 25 µg/ml (Kit et al. 1963), le sous-clone cl1D003 dérive de ce variant. Des cellules DAP tk⁻ agprt⁻ ont été isolées à partir des cellules cl1D tk⁻. Elles prolifèrent dans du milieu contenant de la diaminopurine (DAP) à une concentration de 50 µg/ml (Wigler et al. 1979).

1.9 C3H/10T1/2 clone 8, C3H/MCA clones 15 et 16

Les fibroblastes C3H/10T1/2 clone 8 (ATCC CCL226) dérivent d'une lignée cellulaire obtenue après dissociation des cellules d'un embryon de souris C3H. Ces cellules sont soumises à l'inhibition de contact: elles ne se multiplient plus lorsqu'elles arrivent à confluence. Ces cellules ne provoquent pas de tumeur lorsqu'elles sont injectées dans des souris syngéniques. Le traitement des cellules C3H/10T1/2 clone 8 par le méthylcholanthrène a permis d'obtenir les clones tumorigènes MCA15 et MCA16 (ATCC CRL 1411 et 1412).

1.10 MZ2-MEL.3.1

Le clone MZ2-MEL.3.1 dérive d'un mélanome humain adapté à la culture *in vitro* à partir d'une métastase abominale du patient MZ2 (Hérin et al. 1987).

1.11 CTL-cl1D:16

Le clone de lymphocytes T cytolytiques cl1D:16 a été obtenu à partir de souris C57/Bl6 (H-2^b) immunisées avec 2x10⁵ fibroblastes cl1D vivants et inoculées après 190

jours avec 10^7 fibroblastes c11D irradiés (5.000 rads). Les deux injections ont été faites dans la cavité péritonéale des souris. Huit jours après la seconde injection, les lymphocytes de la cavité péritonéale ont été restimulés *in vitro* dans des conditions de dilution limite. Des lymphocytes (300, 100, 30) ont été cultivés avec $4,5 \times 10^3$ fibroblastes c11D irradiés (5.000 rads) et avec 10^6 splénocytes syngéniques irradiés (2.000 rads) dans un milieu contenant 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires (voir IV.I.2.2).

1.12 CTL-K^k.8

Le clone de lymphocytes T cytolytiques K^k.8 a été obtenu à partir de souris DBA/2 (H-2^d) immunisées avec 10^5 cellules P1.HTR.K^k vivantes et inoculées après 23 jours avec 3×10^6 cellules P1.HTR.K^k irradiées (8.000 rads). Les deux injections ont été faites dans la cavité péritonéale des souris. Cinq jours après la seconde injection, les lymphocytes de la cavité péritonéale ont été restimulés *in vitro* dans des conditions de dilution limite. Les lymphocytes ont été cultivés avec 3×10^3 cellules P1.HTR.K^k irradiées (5.000 rads) et avec 10^6 splénocytes syngéniques irradiés (3.000 rads) dans un milieu contenant 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires et du HAT.

2. CULTURES CELLULAIRES

2.1 Lignées tumorales et fibroblastiques

Les cellules du mastocytome P815, les leucémies LEA, LEB, LEB et TH, le myélome C1.18.4 et le lymphome BW5147 poussent en suspension dans des boîtes de Petri (Falcon 1001), ou s'attachent faiblement à la surface de boîtes ou de bouteilles traitées pour la culture de tissu (Falcon 3003 ou bouteilles de 25 ou 80 cm² Nunc). Les récipients traités sont utilisés pour la culture des cellules adhérentes: les différents clones de fibroblastes ainsi que les cellules K1735, NT et MZ2-MEL.3.1. Ces cellules sont récoltées après une incubation de courte durée (~3 minutes) à température ambiante avec une solution PBS (NaCl $1,37 \times 10^{-1}$ M, KCl $2,6 \times 10^{-3}$ M, Na₂HPO₄.2H₂O $6,4 \times 10^{-3}$ M, KH₂PO₄.6H₂O $1,4 \times 10^{-3}$ M) contenant de l'EDTA (2×10^{-3} M), ou à 37°C avec une solution contenant de la trypsine et de l'EDTA (Gibco 45300-019).

Les cellules dérivées du mastocytome P815, le myélome C1.18.4, les mélanomes et les différentes lignées fibroblastiques sont cultivés dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco 074-01600, NaHCO₃ 3,7 g/l, streptomycine 100 mg/l, pénicilline 2×10^5 U/l) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Gibco 011-06290).

Les cellules dérivant des tumeurs LEA et LEC sont cultivées dans du milieu DMEM contenant du glucose (3,5 g/l), de l'HEPES (10^{-2} M, (pH 7,2)), des acides aminés: L-Arginine ($5,5 \times 10^{-4}$ M), L-Asparagine ($2,4 \times 10^{-4}$ M), L-Glutamine ($1,5 \times 10^{-3}$ M), du β mercaptoéthanol (5×10^{-5} M) et 10% FCS. Ce milieu est appelé MLC.

Les cellules LEB1 et TH1821 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco 074-01800, NaHCO₃ 2 g/l, streptomycine 100 mg/l, pénicilline 2×10^5 U/l, HEPES 2,38 g/l) contenant du β mercaptoéthanol (5×10^{-5} M) et 10% FCS.

Les cellules BW5147 sont cultivées dans un milieu ID (Iscove's modified Dulbecco's medium, Gibco 074-02200, NaHCO₃ 3,024 g/l, streptomycine 100 mg/l, pénicilline 10^5 U/l) contenant 10% FCS.

Toutes les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 8% de CO₂.

2.2 Clones CTL

Pour la culture des clones CTL anti-H-2^k (CTL-cl1D:16 et CTL-K^k:8), on transfère tous les 3 à 5 jours de 6×10^4 à 10^5 CTL dans des plaques à 24 puits contenant 5×10^6 splénocytes irradiés (3.000 rads) provenant de souris CBA/Ht qui servent à la fois de cellules nourricières et de cellules stimulantes. Ces cultures sont effectuées dans 1 ml de milieu MLC contenant 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires comme source d'IL-2 (Ryser 1978). Ce surnageant est obtenu en incubant 5×10^7 splénocytes de souris C57/Bl6 (H-2^b) avec 10^8 splénocytes irradiés (3.000 rads) de souris DBA/2 (H-2^d) dans du milieu MLC. Après 14 jours d'incubation à 37°C, ces lymphocytes sont restimulés avec 10^8 splénocytes DBA/2 irradiés. Après 24 heures d'incubation, le surnageant est récolté et filtré.

Pour le clone CTL-LEC1:5, on transfère tous les 3 à 5 jours de 6×10^4 à 10^5 CTL dans des puits contenant 5×10^6 splénocytes syngéniques irradiés comme cellules nourricières et 4×10^5 cellules LEC1 ou LEC1.aza^R tuées par irradiation (5.000 rads) ou

par du HAT (Hypoxanthine 10^{-4} M, Aminoptérine $3,8 \times 10^{-7}$ M, Thymidine $1,6 \times 10^{-5}$ M) comme cellules stimulantes. Le milieu contient 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires ou 1% de surnageant de cellules du thymome EL-4 cultivées pendant 24 heures dans du milieu MLC contenant du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) à une concentration de 10 ng/ml (Farrar et al. 1980).

Au cours du transfert précédant les tests de stimulation, les cultures de CTL sont simplement divisées en 2 ou 3 et du milieu MLC contenant de l'IL-2 est ajouté dans chaque puits pour obtenir un volume final de 1 ml.

Les CTL sont incubés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 8% de CO₂.

3. TRANSFECTION

La technique qui a été utilisée pour transfecter les cellules P815 et MZ2-MEL est la coprécipitation de l'ADN et du phosphate de calcium (Graham & Van der Eb 1973, Wigler et al. 1979).

3.1 Cellules P815

A. Méthode

Jour 0: transfection

Deux tubes sont nécessaires pour préparer le coprécipité ADN-phosphate de calcium. Le tube A contient l'ADN à transfecter dans 937,5 µl de TE de transfection (Tris 10^{-3} M (pH 7,9), EDTA 10^{-4} M) et 312,5 µl de CaCl₂ 1M. Le tube B contient 1,25 ml de tampon HBS 2x (5×10^{-2} M HEPES, $2,8 \times 10^{-1}$ M NaCl, $1,5 \times 10^{-3}$ M Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,1). Le contenu du tube A est ajouté goutte à goutte dans le tube B. Durant cette opération, les solutions sont mélangées par un "bullage" effectué dans le tube B. Le mélange est laissé 45 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, 5×10^6 de cellules P815 sont transférés dans un tube de 50 ml (Falcon 2070) qui est centrifugé 10 minutes à 300 g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans le coprécipité ADN-phosphate de calcium (2,5 ml). Après une incubation de 20 minutes

dans un bain-marie à 37°C, 22,5 ml de milieu sont ajoutés dans le tube et les cellules sont transférées dans une bouteille qui est mise à l'incubateur.

Jour +1: changement de milieu

Les cellules en suspension sont transférées dans un tube et 30 ml de milieu frais sont immédiatement ajoutés sur les cellules qui adhèrent au fond de la bouteille. Le tube est centrifugé, le surnageant est éliminé, les cellules sont resuspendues dans 10 ml de milieu frais et remises dans la bouteille.

Jour +2: mise en milieu sélectif

Les transfectants obtenus avec les cellules P1.HTR.tk⁻ et P1.HTR.K^kD^k sont sélectionnés respectivement avec 1,5 mg/ml de G418 (Gibco) et 350 µg/ml d'hygromycine B (Calbiochem). La majorité des cellules transfectées (16×10^6) est sélectionnée dans 80 ml de milieu liquide (DMEM additionné de glutamine ($1,5 \times 10^{-3}$ M), d'antibiotique et de 10% FCS). Pour estimer le nombre de transfectants indépendants obtenus, 2×10^6 de cellules sont répartis dans 2 boîtes de Petri contenant 5 ml de milieu semi-solide (milieu de sélection avec 0,3 à 0,4% d'agar (Bacto-agar, Difco)). Après environ une semaine, les cellules qui prolifèrent dans ces boîtes donnent naissance à des colonies visibles au microscope. Pour calculer le nombre de transfectants indépendants obtenus en traitant 5×10^6 cellules, le nombre moyen de colonies par boîte est multiplié par 5 (il y avait 10^6 cellules par boîte) et par ~3 (ce facteur correspond à l'efficacité de clonage des cellules P815 en agar).

~Jour +8: élimination des cellules mortes

Les cellules sont centrifugées 20 minutes à 800 g sur Ficoll-Paque (Pharmacia). Les cellules mortes sont dans le fond du tube et les cellules vivantes sont à l'interface milieu-ficoll. Les cellules vivantes sont récoltées, lavées dans du DMEM-FCS 10% et distribuées dans des bouteilles contenant du milieu frais.

B. ADN transfectés

Les cellules P1.HTR.tk⁻ ont été cotransfectées avec 1 µg du plasmide pSVtknéo^β (Annexe III), 1 µg du plasmide pBR322.H-2K^k et 4 µg du cosmide k12.1 codant la

molécule D^k, ou avec 3 µg du plasmide pSVtknéo^β, 4 µg du plasmide pBR322.H-2K^k et 4 µg d'un fragment EcoRI-HindIII de 8,5 kb contenant le gène D^k. Ce fragment provient de la digestion du cosmide k12.1 et a été isolé par électroélution.

Les cellules P1.HTR.K^kD^k ont été cotransfectées avec 1 à 3 µg d'ADN du cosmide pHMR272 (Annexe III) et avec l'ADN à tester: 30 à 60 µg d'ADN génomique ou de groupes de cosmides, 10 à 20 µg d'ADN de cosmides, de phages ou de plasmides recombinants, ou 2 à 20 µg d'ADN de fragments non clonés isolés par électroélution.

3.2 Cellules MZ2-MEL.3.1

A. Méthode

jour -1: Préparation des cellules

Des bouteilles sontensemencées avec $4,5 \times 10^5$ cellules dans 4,5 ml de milieu.

jour 0: transfection

Les coprécipités ADN-phosphate de calcium (0,5 ml) sont ajoutés dans les bouteilles.

jour +1: changement de milieu

Le milieu est renouvelé sans décoller les cellules.

jour +2: mise en milieu sélectif

Les cellules sont décollées et transférées dans des bouteilles contenant 15 ml de milieu avec du G418 (2 mg/ml).

B. ADN transfectés

Les cellules MZ2-MEL.3.1 ont été cotransfectées avec 5 µg du fragment BamHI-BamHI de 9 kb cloné dans le vecteur pTZ18R, 10 µg du cosmide k12.1 codant la molécule H-2 D^k (Stephan et al. 1986) et 2 µg du plasmide pRc/RSV contenant le gène de résistance à la néomycine (Invitrogen).

4. IDENTIFICATION DE CELLULES EXPRIMANT UN ANTIGENE RECONNU PAR DES ANTICORPS

Le niveau d'expression des molécules de classe I de l'haplotype H-2^k a été mesuré par cytofluorimétrie. Les cellules sont détachées à l'EDTA si nécessaire, récoltées, lavées et resuspendues à froid à une concentration de 10^7 cellules/ml dans du milieu HCF (NaCl $1,37 \times 10^{-1}$ M, KCl 5×10^{-3} M, Na₂HPO₄·2H₂O 3×10^{-4} M, KH₂PO₄ 7×10^{-4} M, MgSO₄·7H₂O 4×10^{-4} M, MgCl₂·6H₂O 3×10^{-4} M, glucose 5×10^{-3} M, NaHCO₃ 4×10^{-3} M, EDTA 10^{-3} M, streptomycine 100 mg/l, pénicilline 10^5 U/l) contenant 3% de FCS décomplémenté (chauffé 30 minutes à 65°C). On ajoute 10^6 cellules à des micropuits à fond plat contenant 10 µl d'anticorps de souris anti-K^k (ascite de l'hybridome 16-3-1N; ATCC HB 25). Après 45 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées, resuspendues dans 100 µl de milieu HCF-FCS 3% et transférées dans une autre plaque dont les micropuits contiennent 10 µl de GAM-FITC (anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et couplés à la fluoroscéine, Becton Dickinson). Après 45 minutes d'incubation à froid, les cellules sont lavées, resuspendues dans 200 µl de milieu HCF-FCS 3% et fixées par l'addition de 200 µl de paraformaldéhyde 1,5%. Les cellules sont alors analysées dans un cytomètre en flux ATC 3000 (Bruker Wissembourg, France).

5. IDENTIFICATION DE CELLULES EXPRIMANT UN ANTIGENE RECONNU PAR DES CTL

5.1 Test de stimulation

Ce test permet d'identifier des populations de cellules contenant seulement 3% de cellules qui expriment un antigène. Ce test est réalisé avec des CTL spécifiques de cet antigène et qui sont dépendants de sa présence pour proliférer de façon optimale (Wölfel et al. 1987).

Les transfectants obtenus avec les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.2, cl.5 et cl.6 ont été répartis dans des micropuits à fond rond à raison de 30 cellules par puits, ceux obtenus

avec les cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b ont été testés par groupes de 25. Pour chaque groupe de transfection, le nombre de micropuits ensemencés est adapté de façon à ce que chaque transfectant indépendant soit testé en moyenne 5 fois. Après 5 à 6 jours, un échantillon de ~20 µl de chaque microculture est transféré dans un nouveau micropuits contenant 180 µl de milieu frais et est gardé à 30°C. Le lendemain, les microplaques à tester sont irradiées (5.000 rads), centrifugées, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 100 µl de milieu MLC. On ajoute dans chaque microculture 100 µl contenant de 2.000 à 3.000 CTL-LEC1:5 qui ont été cultivés sans cellules stimulantes pendant 2 à 4 jours, 10⁶ splénocytes syngéniques irradiés (3.000 rads), de l'IL-2 recombinante humaine (40U/ml; don de Biogen, Genève, Suisse) et du HAT 2x dans du milieu MLC. Après 6 à 7 jours, les microplaques sont examinées au microscope pour évaluer la prolifération des CTL. Des échantillons (100 µl) de toutes les microcultures des plaques contenant des puits positifs sont transférés dans des micropuits contenant de 1.500 à 6.000 cellules LEC1 ou LEC1.azaR marquées au chrome-51. La lyse est mesurée après une incubation de 4 heures à 37°C.

Pour les tests effectués avec les transfectants des cellules P1.HTR.K^kD^k cl.1b, du surnageant d'une culture de cellules d'insectes infectées par un baculovirus contenant le cDNA codant pour l'IL-4 murine (don de J. Van Snick) a été ajouté à une concentration finale de 1/1.000 (v/v). L'activité lytique des microcultures a été mesurée après 4 à 5 jours.

5.2 Test visuel de lyse

Ce test permet d'identifier rapidement des clones de cellules qui expriment un antigène (Maryanski & Boon 1982).

A. Clonage de cellules

Les cellules sont récoltées et resuspendues dans une solution PBS-EDTA pour dissocier complètement les amas cellulaires. Après quelques minutes, du milieu est ajouté et les cellules sont réparties dans des micropuits à fond rond à raison de 1.000 cellules par puits lorsque le clonage se fait en même temps que la sélection des transfectants et de 0,2 cellules par puits lorsque le clonage est réalisé après la sélection. Après quelques jours, les puits contenant des cellules sont identifiés au microscope. La nature clonale de ces puits peut être estimée grâce à la loi de Poisson. Lorsque moins de

20% des puits sont positifs, il y a moins d'une chance sur dix qu'ils contiennent la descendance de plusieurs cellules.

Les clones peuvent aussi être obtenus en repiquant des colonies dans le milieu sélectif semi-solide.

B. Identification des clones positifs

Environ 10^3 cellules de chaque clone sont incubées dans des micropuits à fond rond soit seules, soit avec $2-5 \times 10^4$ CTL. Après une incubation de 24 heures, les plaques sont regardées au microscope. Les clones qui sont lysés sont identifiés en comparant le nombre de cellules vivantes dans les puits qui contiennent des CTL et dans ceux qui n'en contiennent pas. Pour faciliter cette observation, les CTL utilisés sont séparés des splénocytes et des cellules stimulantes par une centrifugation sur Ficoll-Paque.

5.3 Test de relargage de chrome-51

Ce test permet de quantifier la lyse de cellules (cibles) par des CTL (effecteurs) (Cerottini & Brunner 1974; Boon et al. 1980).

Environ 10^6 cellules sont récoltées et resuspendues dans 100 μ l de milieu DMEM-FCS 10% et 0,2 mCi (7,4 MBq) de chrome-51 sous forme de chromate de sodium en solution dans un liquide physiologique (IRE). Les cellules sont incubées pendant 1 heure dans un bain marie à 37°C. Le tube est agité toutes les 10 minutes de façon à empêcher la formation d'un culot cellulaire. A la fin du marquage, les cellules sont lavées deux fois dans 12 ml de DMEM-FCS 10%. Les cellules sont resuspendues dans ce milieu à une concentration variant de $1,5 \times 10^4$ à 6×10^4 cellules/ml pour les tests de stimulation et de 2×10^4 cellules/ml pour les autres tests. 100 μ l de cellules marquées sont ajoutés à des micropuits à fond conique contenant 100 μ l de CTL. Les plaques sont incubées 4 heures à 37°C. Après centrifugation, 100 μ l de surnageant de chaque micropuits sont prélevés. La radioactivité présente dans ces échantillons est mesurée au moyen d'un compteur gamma.

$$\text{Le pourcentage de lyse spécifique} = \frac{(R-R_m) \times 100}{R_m - R_m}$$

où R = relargage spécifique pour un micropuits contenant
100 μ l de cellules avec 100 μ l de CTL

R_m = relargage spontané moyen pour 4 micropuits contenant
100 μ l de cellules et 100 μ l de milieu

RM = relargage maximum moyen pour 4 micropuits contenant

100 µl de cellules et 100 µl de triton 0,3%

Ces relargages sont mesurés en coups par minute.

Les pourcentages de lyse spécifique sont mesurés sur des duplicats (sauf pour les tests de stimulation).

5.4 Test de production de TNF

Ce test permet aussi d'identifier des populations de cellules contenant une minorité de cellules qui expriment un antigène. Ce test est réalisé avec des CTL qui sécrètent du TNF lorsqu'ils sont activés par leur antigène (Traversari et al. 1992).

Des micropuits sontensemencés avec 2.000 transfectants. Après 3 à 5 jours, les microplaques sont centrifugées, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 50 µl de milieu MLC. 2.000 CTL-LEC1:5 sont ajoutés à chaque microculture dans 50 µl de milieu MLC contenant de l'IL-2 recombinante humaine (40U/ml), de l'IL-4 murine (0,2% de surnageant) et du HAT 2x. Après environ 20 heures d'incubation à 37°C, les plaques sont centrifugées et 50 µl de surnageant de chaque microculture sont transférés dans un micropuits à fond plat contenant 3x10⁴ cellules WEHI 164 clone 13 (WEHI) (Espevik & Nissen-Meyer 1986) dans 50 µl de milieu RPMI contenant des acides aminés: L-Arginine (5,5x10⁻⁴M), L-Asparagine (2,4x10⁻⁴M), L-Glutamine (1,5x10⁻³M), de l'actinomycine D (2 µg/ml), du LiCl (4x10⁻²M) et 5% FCS. L'actinomycine D permet de réduire la durée du test et le LiCl augmente sa sensibilité (Beyaert et al. 1989). Après 24 heures d'incubation à 37°C, le nombre de WEHI vivantes est estimé par un test colorimétrique. On ajoute dans chaque micropuits 50 µl d'une solution de PBS (section 2.1) contenant 2,5 mg/ml de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide (MTT, Merck). Le MTT (jaune) se transforme en bleu formazan sous l'action de déhydrogénases actives uniquement dans les mitochondries des cellules vivantes. Après 4 heures à 37°C, on ajoute dans chaque micropuits 100 µl d'une solution de lyse. Cette solution est préparée en ajoutant 1 volume de N,N-diméthylformamide à 2 volumes d'une solution SDS 30% et en portant le pH de ce mélange à 4,7 avec 2,5% d'une solution d'acide acétique 80% et 0,25% de HCl 1M. Après 24 heures à 37°C, les cristaux sont dissous et la densité optique de chaque puits est mesurée à 570 nm en utilisant une longueur d'onde de référence de 650 nm.

Le pourcentage de cellules mortes = $100 \times [1 - \text{DO de l'échantillon} / \text{DO du contrôle négatif}]$

6. RECONNAISSANCE DE CELLULES INCUBEES AVEC DES PEPTIDES SYNTHETIQUES PAR LES CTL-LEC1:5

Les peptides ont été synthétisés par Catherine Servis (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne Branch, Institute of Biochemistry, University of Lausanne) en utilisant la méthode décrite par Atherton et al. (1981).

6.1 Test de relargage de chrome-51

Les cellules marquées au chrome-51 et lavées sont resuspendues à une concentration de 4×10^4 cellules/ml. Des échantillons de 50 μl sont ajoutés à des micropuits à fond conique contenant différentes dilutions de peptides (50 μl). Après une incubation de 30 minutes à 37°C, on ajoute dans chaque puits 100 μl contenant 2×10^4 CTL-LEC1:5. Le pourcentage de chrome-51 relargué spécifiquement est mesuré après 4 heures d'incubation à 37°C.

6.2 Test de production de TNF

On dépose 2×10^4 cellules (50 μl) dans des micropuits à fond conique contenant soit 50 μl de milieu, soit 50 μl de milieu avec le peptide gag.88-96 à une concentration de 94 nM. Après 2 heures d'incubation à 37°C, on ajoute 140 μl de milieu et on centrifuge les plaques 5 minutes à 300 g. Les cellules sont resuspendues dans 100 μl de milieu MLC contenant 2.000 CTL-LEC1:5, de l'IL-2 (20U/ml) et de l'IL-4 (0,1% de surnageant), ou dans 100 μl de milieu MLC contenant uniquement les interleukines. On mesure ensuite la cytotoxicité du surnageant (50 μl) sur 3×10^4 cellules WEHI et on calcule le pourcentage de lyse spécifique des cellules WEHI (= % lyse avec des CTL $\pm$ peptides - % lyse sans peptide et sans CTL).

IV.II GENETIQUE MOLECULAIRE

1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

L'isolement d'ADN génomique de haut poids moléculaire s'effectue d'après les techniques de Gross-Bellar et al. (1973), Blin & Stafford (1976), Heidmann & Rougeon (1982).

Les cellules sont récoltées et lavées 2 fois dans du tampon PBS froid. Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration de $\sim 10^7$ cellules/ml dans une solution 10mM Tris (pH 8), 10mM EDTA (pH 8) contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ de protéinase K (Merck, solution stock à 20 mg/ml dans de l'eau et conservée à -20°C). Les cellules sont lysées par addition de 1% de SDS.

Les reins sont prélevés, plongés immédiatement dans de l'azote liquide et broyés. La poudre est resuspendue dans une solution 10mM Tris (pH 8), 10mM EDTA (pH 8), 1% SDS contenant 200 $\mu\text{g/ml}$ de protéinase K. Les lysats sont incubés pendant ~ 16 heures à 37°C avec agitation.

Les lysats sont extraits 2 fois au phénol: on ajoute 1 volume de phénol, on agite le mélange jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène, puis on le centrifuge 10 minutes à 12.000 g et on récolte la phase aqueuse. Cette phase est ensuite extraite avec le mélange chloroforme - alcool isoamylique (24/1) pour éliminer les traces de phénol. Puis, elle est dialysée pendant ~ 16 heures à température ambiante dans 2 litres de tampon 10mM Tris (pH 8), 1mM EDTA (pH 8) et 10mM NaCl. Les acides nucléiques sont ensuite incubés pendant 3 heures à 37°C avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNase pancréatique (Sigma, solution à 10 mg/ml dans 0,15 M NaCl, 10mM Tris (pH 7,5) traitée 10 minutes à 90°C et conservée à -20°C), puis pendant 1 heure à 37°C avec 1% de SDS, 10 mM d'EDTA et 50 $\mu\text{g/ml}$ de protéinase K. Après 1 extraction au phénol et 1 extraction au mélange chloroforme - alcool isoamylique, la solution est dialysée pendant 24 heures (le tampon est changé 3 fois). La concentration d'ADN est de $\sim 4 \mu\text{g}$ d'ADN/ 10^6 cellules.

Pour des PCR et des Southern blots, le lysat traité à la protéinase K est extrait au phénol et au mélange chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité en

ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu. L'ADN est centrifugé 15 minutes à 12.000 g. Le surnageant est soigneusement éliminé et l'ADN est resuspendu dans du TE (10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)) contenant 100 µg/ml de RNase.

2. CONSTRUCTION D'UNE BIBLIOTHEQUE DE COSMIDE

2.1 Préparation des bras du cosmide c2RB

Le cosmide c2RB (Figure II.9) (Bates & Swift 1983) est linéarisé au site unique SmaI. La solution d'ADN est extraite avec le mélange phénol - chloroforme (1/1). L'ADN est précipité en ajoutant 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 3M (pH 7) et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN est resuspendu à une concentration d'environ 100 µg/ml dans une solution 50 mM Tris, 0,1 mM EDTA. Le vecteur est ensuite traité à la phosphatase alcaline pour déphosphoryler les extrémités 5': on ajoute 0,05 U de phosphatase intestinale de veau (Boehringer) par µg d'ADN et on incube la solution 30 minutes à 37°C. Pour inactiver l'enzyme, on ajoute un volume d'une solution 1% SDS, 20 mM Tris (pH 8), 200 mM NaCl et 2 mM EDTA. Après 30 minutes d'incubation à 68°C, la solution est extraite 3 fois avec du phénol et 3 fois avec le mélange chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol et digéré par l'endonucléase de restriction BamHI. La préparation est extraite avec le mélange phénol - chloroforme - alcool isoamylique (25/24/1) et précipitée à l'éthanol.

2.2 Digestion partielle de l'ADN génomique

La digestion partielle de l'ADN génomique s'effectue suivant la technique décrite par Grosveld et al. (1982).

Les conditions de digestion qui donnent le maximum de fragments de ~40 kb sont établies en digérant à 37°C 60 µg d'ADN génomique des cellules LEC.aza^R avec 12 U d'enzyme de restriction Sau3AI. Des échantillons de 2 µg sont prélevés toutes les 10 minutes et transférés à 0°C dans des eppendorfs contenant de l'EDTA pour stopper la digestion. Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse dans un gel contenant 0,3% d'agarose et 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium dans du TAE1x (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA). Après 16 heures de migration à 1,2 volts/cm, les

échantillons sont comparés aux témoins de poids moléculaire pour estimer la taille des fragments et déterminer le temps de digestion optimal.

Une digestion de masse est alors effectuée dans les mêmes conditions sur 300 µg d'ADN. Trois fractions sont récoltées: une au temps de digestion optimal, une 10 minutes avant et une 10 minutes après. Un échantillon (2 µg) de chaque fraction est prélevé pour vérifier la taille des fragments obtenus. Les fractions sont groupées, extraites 2 fois au phénol, 1 fois au chloroforme et précipitées à l'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN est resuspendu dans 500 µl de TE.

2.3 Fractionnement de l'ADN génomique clivé par centrifugation sur gradient de chlorure de sodium

Dans un tube à centrifuger (Beckman, Ultra-Clear 14x95 mm, 344060), on réalise un gradient linéaire de NaCl à partir de deux solutions (1,25 et 5 M) préparées dans un tampon 20 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA. Au sommet de ce gradient, on dépose l'ADN clivé. Après 4 heures de centrifugation à 195.000 g et à 18°C (rotor Beckman SW40 Ti, 33.000 rpm), on récolte 18 fractions de 700 µl avec une micropipette. Ces fractions sont diluées avec 3 volumes de TE. L'ADN est précipité à l'éthanol, centrifugé et resuspendu dans 600 µl de TE. La taille des fragments de chaque fraction est déterminée en analysant un échantillon (30 µl) sur gel d'agarose. La concentration en ADN des fractions contenant des fragments de 35 à 50 kb est déterminée par spectrophotométrie UV: une densité optique de 1 à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml.

2.4 Ligation de l'ADN génomique clivé aux bras du cosmide c2RB et encapsidation *in vitro*

Les bras du cosmide (1,5 µg) et la bonne fraction d'ADN (1,5 µg) sont coprécipités. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 10 µl de tampon de ligation (132 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol, 2 mM ATP). On ajoute alors 1,5 µl de "T4 DNA ligase" (Amersham, 2,5 U/µl) et on incube le mélange 16 heures à 15°C.

Une fraction du mélange de ligation (4 µl) est introduite *in vitro* dans des têtes de phage lambda en utilisant des extraits d'encapsidation commerciaux à haut rendement infectieux (Stratagène, Gigapack II Gold).

2.5 Titration et amplification de la banque de cosmides

A. Préparation des bactéries:

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on ensemence 20 ml de milieu LB (Bacto-Tryptone 10 g/l, Bacto Yeast Extract 5 g/l, NaCl, 10 g/l, pH ajusté à 7,5 avec du NaOH 1M) contenant 0,4% de maltose avec une colonie de bactéries ED8767 (Annexe VI) (Grosveld et al. 1982). Après 16 heures d'agitation à 37°C, la culture est à saturation et est centrifugée 20 minutes à 4.000 g. Les bactéries sont resuspendues dans 0,5 volume d'une solution 10 mM MgCl₂: elles peuvent être infectées dans les 4 heures qui suivent.

B. Titration:

Plusieurs dilutions sont préparées à partir d'un échantillon du mélange d'encapsulation. On ajoute à ces dilutions 100 µl de bactéries. Après 20 minutes d'incubation à 37°C, les mélanges sont dilués avec 1 ml de LB et l'incubation est prolongée d'une heure pour permettre aux bactéries infectées d'exprimer le gène de résistance à l'ampicilline du vecteur c2RB. Les mélanges sont alors étalés sur des boîtes de Petri contenant du "Bottom Agar LB" (milieu LB contenant 15 mg/ml d'agar) avec de l'ampicilline à une concentration de 25 µg/ml. Les boîtes sont incubées 16 heures à 37°C et les colonies bactériennes sont comptées. Ceci permet d'estimer le nombre de cosmides présents dans le mélange d'encapsulation.

C. Amplification des groupes de cosmides:

Plusieurs échantillons du mélange d'encapsulation contenant ~50.000 cosmides sont prélevés. On porte le volume de ces échantillons à 500 µl avec du SM (0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris (pH 7,5), 0,01% gélatine) et on les utilise pour infecter 2 ml de bactéries. Les mélanges sont alors incubés 20 minutes à 37°C, puis dilués avec 20 ml de milieu LB et incubés une heure supplémentaire. Un échantillon de chaque mélange est prélevé pour déterminer le nombre de cosmides présents. Les bactéries infectées sont alors sélectionnées en ajoutant 40 ml de LB et 25 µg/ml d'ampicilline. Les cultures sont agitées pendant 8 heures à 37°C puis titrées pour déterminer le facteur d'amplification obtenu. Un échantillon de chaque groupe de cosmides est congelé et le reste de la culture est utilisé pour produire de l'ADN cosmidique.

3. EXTRACTION D'ADN DE COSMIDES OU DE PLASMIDES

3.1 Extraction d'ADN en petite quantité

Des tubes falcons de 50 ml contenant 5 ml de LB avec de l'ampicilline (25 à 50 µg/ml) sontensemencés avec 1 colonie bactérienne. Les cultures sont agitées à 37°C pendant la nuit. On transfère 1,5 ml de chaque culture dans un eppendorf. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans 100 µl de tampon glucose (50mM de glucose, 25 mM Tris (pH 8) et 10 mM EDTA). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, on ajoute 200 µl d'une solution 1% SDS et 0,2 M NaOH pour lyser les bactéries. Après 5 minutes d'incubation dans un mélange eau - glace, on ajoute 150 µl d'une solution d'acétate de potassium (CH₃COOK 3M et de CH₃COOH 2M) pour précipiter les protéines, l'ADN chromosomique et l'ARN de haut poids moléculaire. Après 5 minutes d'incubation dans un mélange eau - glace, l'eppendorf est centrifugé et le surnageant est extrait avec un mélange phénol - chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN cosmidique ou plasmidique est alors précipité à l'éthanol absolu, centrifugé, puis lavé avec de l'éthanol 70% et resuspendu dans du TE contenant de la RNase (20 µg/ml). Cet ADN est alors clivé par différents enzymes de restriction et le produit de la digestion est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose pour être analysé.

3.2 Extraction d'ADN en grande quantité

Des erlenmeyers de 2 litres contenant 1 litre de LB avec de l'ampicilline (25 à 50 µg/ml) sontensemencés avec des bactéries contenant les cosmides ou les plasmides que l'on désire transférer. Après une nuit d'agitation à 37°C, les cultures sont centrifugées et les bactéries sont resuspendues dans 24 ml de tampon glucose. On lyse ensuite les bactéries avec 4 ml de tampon glucose contenant du lysozyme (20 mg/ml) qu'on laisse agir 10 minutes à température ambiante, puis avec 55 ml d'une solution 1% SDS et 0,2 M NaOH. Après 5 minutes d'incubation dans le mélange eau - glace, on ajoute 28 ml de la solution d'acétate et on prolonge l'incubation de 15 minutes. Le lysat est centrifugé et le surnageant est extrait avec un mélange phénol - chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu, centrifugé et resuspendu dans 10 ml de TE.

L'ADN est ensuite purifié par centrifugation sur un gradient autoformant de chlorure de césium. On ajoute 10 g de CsCl et 800 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml) à la préparation d'ADN. La solution obtenue est déposée dans un tube en polyallomère (Beckman, Quick-seal 16x76 mm, 342413). Les tubes scellés et équilibrés sont centrifugés pendant 48 heures à 191.000 g et à 20°C (rotor Beckman 80 Ti, 45.000 rpm). Après centrifugation, on peut voir au moyen d'une lampe à rayonnement ultra-violet (366 nm) respectivement de haut en bas: i) des aggrégats noirâtres qui flottent au sommet du tube représentant des complexes entre des protéines et le bromure d'éthidium; ii) une bande correspondant à de l'ADN chromosomique bactérien et à de l'ADN cosmidique ou plasmidique circulaire relaxé (un des deux brins est coupé); iii) une bande contenant l'ADN cosmidique ou plasmidique circulaire superenroulé; iv) un culot correspondant à l'ARN bactérien. La séparation des différents types d'acides nucléiques est due à leur différence d'affinité pour le bromure d'éthidium: forte pour l'ADN linéaire et l'ADN circulaire relaxé, moins forte pour l'ADN circulaire superenroulé et faible pour les acides nucléiques simple-brin. Le bromure d'éthidium s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques et diminue leur densité. La bande contenant l'ADN cosmidique ou plasmidique circulaire superenroulé est ponctionnée. Le bromure d'éthidium est éliminé par plusieurs extractions à l'alcool isoamylique saturé en eau. La phase aqueuse (= phase inférieure) est diluée dans 3 volumes de TE et l'ADN est précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN est resuspendu dans du TE de transfection.

4. ENCAPSIDATION DIRECTE

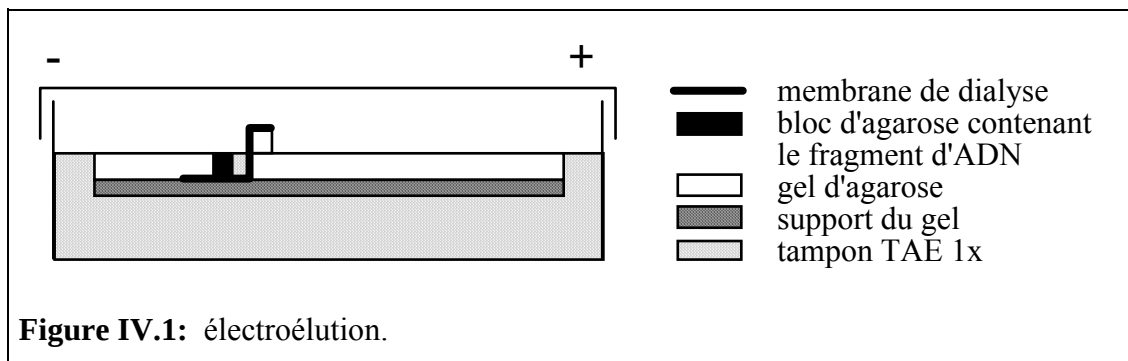
0,8 à 1 µg d'ADN génomique des transfectants cosmidiques est encapsidé *in vitro* dans des extraits de phage lambda. Les produits d'encapsidation sont titrés. Des fractions ou la totalité du produit d'encapsidation ont été utilisées pour infecter 2 ml de bactéries ED8767. Après 20 minutes à 37°C, les bactéries sont diluées avec 20 ml de LB et incubées 1 heure supplémentaire à 37°C. Après centrifugation, elles sont resuspendues dans 2 ml de LB et étalées sur des grandes boîtes de Petri (Nunc 40835) contenant du LB bottom agar avec de l'ampicilline (25 µg/ml). Après une nuit à 37°C, les colonies bactériennes sont récoltées dans ~20 ml de LB. Un échantillon est congelé et le reste est amplifié pour extraire l'ADN cosmidique.

5. EXTRACTION D'ADN DE BACTERIOPHAGES

5.1 Clonage du fragment de 20 kb ScaI-ScaI dans le phage EMBL3A

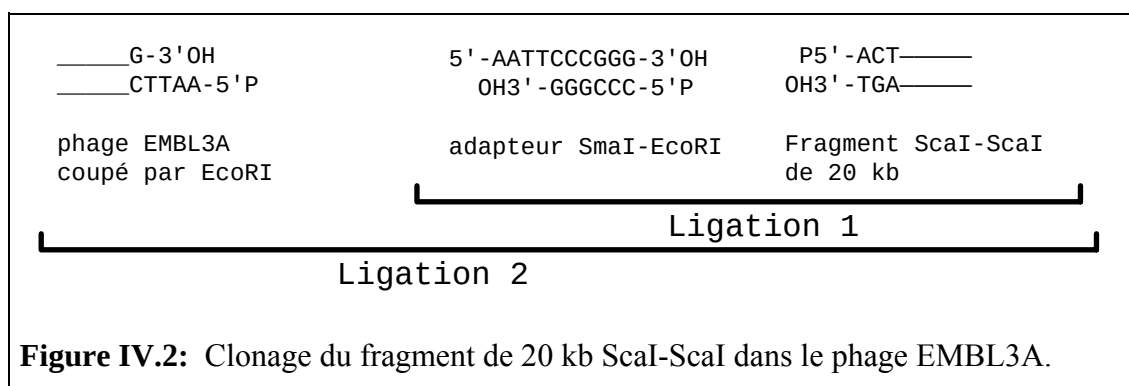
A. Electroélution

400 µg d'ADN du cosmide P5.C3 ont été clivés avec 400 U d'enzyme de restriction ScaI pendant 16 heures à 37°C. Le produit de la digestion a été séparé sur un gel d'agarose 0,7% et les différents fragments ont été isolés par électroélution: le bloc d'agarose contenant le fragment de restriction à purifier est placé sur une membrane à dialyse selon le montage représenté ci-dessous. Sous l'action du champ électrique, l'ADN sort de l'agarose et est arrêté par la membrane. Le courant est ensuite inversé pendant 1 minute pour décrocher l'ADN de la membrane. Le tampon contenant l'ADN est extrait au phénol - chloroforme - alcool isoamylique et l'ADN est précipité à l'éthanol.



B. Clonage

Des adaptateurs SmaI-EcoRI (0,04 µg) sont ligués aux extrémités droites du fragment de 20 kb ScaI-ScaI (1 µg) pendant 16 heures à température ambiante. Le fragment de 20 kb est ensuite purifié après séparation sur gel 0,5% de "low melting agarose". La bande contenant le fragment de 20 kb est transférée dans un eppendorf et incubée 10 minutes à 65°C. On ajoute un volume de TE à l'agarose fondu et on extrait le mélange 2 fois au phénol et 1 fois au chloroforme. Après précipitation à l'éthanol, le fragment de 20 kb (~0,35 µg) est ligué à l'ADN du phage EMBL3A (Annexe IV) clivé par l'enzyme de restriction EcoRI (0,5 µg).



Une fraction du mélange de ligation est encapsidée dans des extraits de phage lambda. Des dilutions du produit d'encapsidation sont utilisées pour infecter 200 µl de bactéries NM539 P2 (Annexe VI) (Frischauf et al. 1983) préparées selon la procédure décrite à la section 2.5.A. Après 20 minutes d'incubation à 37°C, on ajoute au mélange 3 ml de "Top Agar BTCYM" fondu (milieu BTCYM [Bacto-Tryptone 10 g/l, NaCl 5 g/l, Casamino Acids 1 g/l, Bacto Yeast Extracts 5 g/l, MgSO₄.7H₂O 2 g/l] contenant 7 mg/ml d'agar) et on l'étale sur une boîte de Petri contenant du "Bottom Agar BTCYM" (milieu BTCYM contenant 15 mg/ml d'agar). Les boîtes sont incubées pendant la nuit à 37°C.

5.2 Préparation d'une suspension de phages

Des plages de lyse sont repiquées dans 200 µl de SM. Après 4 à 6 heures à 4°C, 100 µl sont utilisés pour infecter 200 µl de bactéries NM539 P2. On ajoute du "Top Agarose BTCYM" aux bactéries infectées et on les étale sur des boîtes contenant du "Bottom Agarose BTCYM". On utilise de l'agarose car l'agar contient des impuretés qui

inhibent l'activité des enzymes de restriction. Après une nuit d'incubation à 37°C, on ajoute dans chaque boîte 5 ml de SM contenant 1 µg/ml de RNase A et 1 µg/ml de DNase I et on les agite pendant ~2 heures à température ambiante. Le liquide est ensuite récolté et les débris bactériens sont éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 8.000 g.

5.3 Extraction d'ADN en petite quantité

On ajoute à la suspension de phages 1 volume d'une solution contenant 20% de polyéthylène glycol et 2 M NaCl dans du SM. Après une heure d'incubation dans un mélange eau - glace, la suspension est centrifugée 20 minutes à 10.000 g et à 4°C. Le surnageant est soigneusement éliminé et les phages sont resuspendus dans 0,5 ml de SM. Les débris sont éliminés par une centrifugation de 2 minutes à 8.000 g et on ajoute au surnageant 10 µl de SDS 10% et 5 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8). Le mélange est incubé pendant 15 minutes à 68°C, puis extrait 1 fois au phénol, 1 fois au phénol - chloroforme (1/1) et 1 fois au chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN est précipité et resuspendu dans 30 à 50 µl de TE contenant de la RNase (20 µg/ml). L'ADN est ensuite clivé par différents enzymes de restriction et analysé après séparation sur gel d'agarose.

5.4 Extraction d'ADN en grande quantité

L'obtention d'une grande quantité d'ADN de phages se fait en trois étapes: l'infection d'un grand nombre de bactéries, la purification des phages à partir de la culture lysée et l'extraction d'ADN.

On ensemence un erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu BTCYM et 0,4% de maltose avec une colonie de NM539 P2. Après une nuit d'agitation à 37°C, on mesure la densité optique de la culture bactérienne à 600 nm: une densité optique de 1 correspond à une concentration de $\sim 8 \times 10^8$ bactéries/ml. Une fraction de la culture contenant $\sim 10^{11}$ bactéries est centrifugée et les bactéries sont resuspendues dans 10 ml de MgSO₄ 10 mM. Ces bactéries sont infectées avec $\sim 10^{10}$ particules de phage. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, le mélange est transféré dans un erlenmeyer de 2 litres contenant 1 litre de milieu BTCYM. Après ~5 heures d'agitation à 37°C, la turbidité du milieu diminue et des débris bactériens apparaissent: les bactéries sont lysées. On lyse les bactéries qui sont encore intactes en agitant vigoureusement la culture après y avoir ajouté 20 ml de chloroforme et 120 ml de NaCl 5M. Les débris bactériens sont éliminés

par une centrifugation de 10 minutes à 8.000 g et à 4°C. On ajoute au surnageant 10 ml de MgSO₄ 1 M et 120 g de PEG-6.000 (polyéthylène glycol). Après une nuit d'agitation à 4°C, le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 8.000 g et à 4°C, le surnageant est éliminé et les phages sont resuspendus dans 15 ml de SM. La suspension est extraite deux fois au chloroforme.

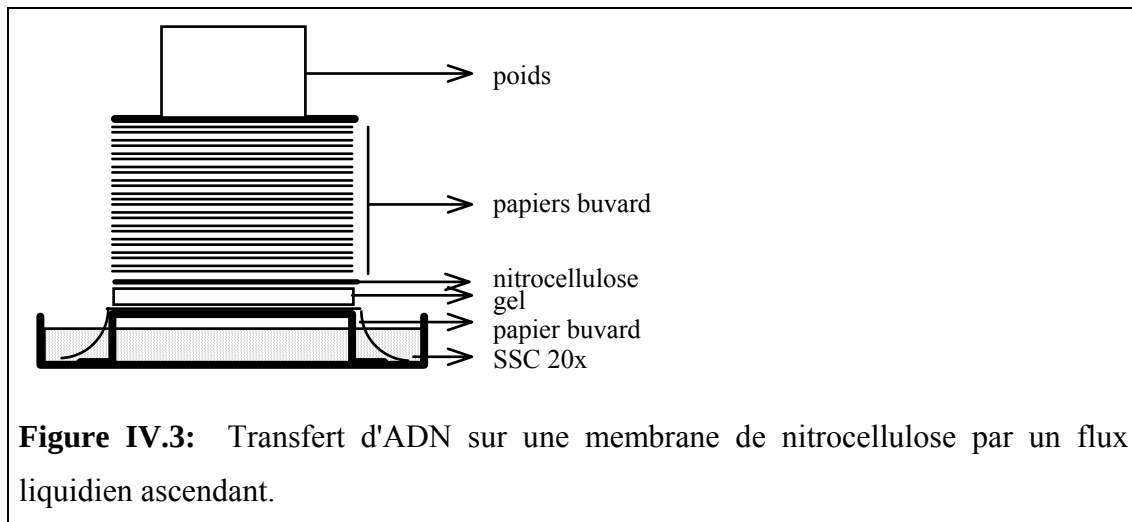
Les bactériophages sont ensuite purifiés par deux centrifugations successives dans des gradients de chlorure de césium. On ajoute 7,5 g de CsCl à 10 ml de la phase aqueuse. Après dissolution, on transfère 11,5 ml dans un tube (Beckman, Ultra-Clear 14x95 mm, 344060) que l'on centrifuge 24 heures à 218.000 g et à 20°C (rotor Beckman SW40 Ti, 35.000 rpm). Les particules de phage forment une bande visible à la lumière ambiante. Cette bande est ponctionnée et diluée dans une solution contenant 1,5 g de CsCl/ml dans du SM. On utilise les mêmes conditions pour le second gradient.

Pour éliminer le CsCl et isoler l'ADN des phages, on ajoute 25 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8) et 12,5 µl de protéinase K (solution à 20 mg/ml) pour 100 µl de suspension de phages. Le mélange est dialysé pendant 3 heures à 37°C dans deux litres de tampon 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8) et 0,5 M NaCl (le tampon est changé toutes les heures). Le mélange est ensuite extrait 1 fois au phénol, 1 fois au phénol - chloroforme - alcool isoamylique et 1 fois au chloroforme - alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol et est resuspendu dans du TE de transfection.

6. CARTE DE RESTRICTION DU FRAGMENT DE 9 kb BamHI-BamHI

Le fragment de 9 kb BamHI-BamHI a été cloné dans le plasmide pTZ18R (Pharmacia; Annexe V). Le plasmide recombinant a été linéarisé au site unique ScaI du plasmide, puis a été digéré partiellement avec l'un des enzymes de restriction suivants: EcoRI, SmaI, XbaI, SalI. Ces enzymes possèdent un site de reconnaissance dans le site multiple de clonage du vecteur et un ou plusieurs sites dans l'insert. Les fragments de restriction ont été séparés sur un gel d'agarose 0,5%. Après avoir placé une latte à côté des témoins de poids moléculaire, le gel a été photographié. Les fragments d'ADN ont ensuite été dénaturés in situ avec une solution 0,5 M NaOH et 1,5 M NaCl. Le gel a ensuite été neutralisé dans une solution 0,5 M Tris et 3 M NaCl mise à pH 7. Les fragments d'ADN ont été transférés ("blottés") sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuel, BA85). Le transfert a été effectué par un flux d'une solution SSC

20x (3M NaCl et 0,3 M citrate de sodium). Pour créer le flux liquidien, le montage illustré à la figure IV.3 a été réalisé.



Après ~16 heures, le gel et la nitrocellulose sont récupérés. L'emplacement des puits est indiqué sur la nitrocellulose. Celle-ci est rincée dans une solution SSC 6x. Après une cuisson de 2 heures à 80°C sous vide, la membrane de nitrocellulose est préincubée pendant 4 heures à 65°C dans une solution SSC 6x et Denhardt 10x (0,2% de Ficoll, 0,2% de polyvinyl pyrrolidone, 0,2% d'albumine bovine sérique).

Les fragments d'ADN sont hybridés avec un oligonucléotide complémentaire d'une séquence située à côté du site multiple de clonage du vecteur ("universal primer" ou "reverse primer"). L'oligonucléotide (100 ng) a été marqué au phosphore-32 (Amersham, [α -32P]dCTP 3.000 Ci/mmol, PB 10205) avec la transférase terminale (GIBCO-BRL, 15 U/ μ l). Les nucléotides non incorporés sont ensuite éliminés par passage sur une colonne CHROMA SPIN-10 (Clontech). L'hybridation est effectuée pendant 16 heures à 42°C dans une solution SSC 6x, Denhardt 1x, SDS 0,1% contenant de l'ADN de sperme de saumon dénaturé 5 minutes dans de l'eau bouillante (100 μ g/ml) et l'oligonucléotide marqué.

La nitrocellulose est ensuite lavée dans une solution SSC 6x: 2 fois 5 minutes à température ambiante et 1 fois 5 minutes à une température légèrement inférieure (2 à 5°C) à la température de dissociation de l'oligonucléotide (T_d). Cette température peut être calculée par la loi de Wallace: $T_d = (\text{No. GC} \times 4^\circ\text{C}) + (\text{No. AT} \times 2^\circ\text{C})$. Les filtres sont séchés et autoradiographiés (films Kodak, X-OMAT AR - 165 1454).

La carte de restriction du fragment BamHI-BamHI de 9 kb est alors construite en déterminant la taille des différents fragments marqués. La comparaison des résultats

obtenus avec le "universal primer" et avec le "reverse primer" permet d'augmenter la précision de cette carte. Ces oligonucléotides sont situés de part et d'autre du site multiple de clonage du vecteur.

7. OBTENTION DE CLONES DELETES PAR L'EXONUCLEASE III

Des sous-clones possédant des inserts de plus en plus courts ont été produits à partir du plasmide pTZ18R contenant l'insert BamHI de 9 kb et à partir du clone ExoIII 17b avec le kit "Erase-a-Base" de Promega. Ce kit utilise l'exonuclease III qui exerce son activité de 3' en 5' sur de l'ADN double-brin à partir du 3'OH d'extrémités droites (SmaI, ScaI,...) ou 5' saillantes (EcoRI, XbaI, HindIII, BamHI, SalI, SpeI,...). Cet enzyme n'attaque pas les extrémités 3' saillantes (SacI, SphI, KpnI, PstI,...). Le plasmide recombinant est digéré de façon à obtenir une extrémité droite ou 5' saillante du côté de l'insert à déléter et une extrémité 3' saillante près du vecteur (de façon à digérer l'insert, mais pas le vecteur).

Le plasmide pTZ18R contenant le fragment BamHI-BamHI de 9 kb a été digéré par les enzymes SpeI et KpnI. Le produit de la digestion a été extrait au phénol - chloroforme et l'ADN (10 µg) a été précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN a été resuspendu dans 60 µl de tampon ExoIII 1x et incubé à 37°C. Après avoir ajouté 500 U d'exonuclease III, on transfère toutes les 30 secondes 2,5 µl du mélange dans un eppendorf contenant 7,5 µl d'un mélange avec de la nucléase S1. Tous les eppendorfs sont maintenus dans un mélange eau - glace jusqu'à ce que le dernier échantillon soit prélevé. On incube ensuite les eppendorfs 30 minutes à température ambiante: la nucléase S1 dégrade les extrémités simple-brin générées par l'exonuclease III. On ajoute ensuite 1 µl de tampon stop pour la S1 et on inactive l'enzyme en incubant le mélange 10 minutes à 70°C. Un échantillon de 2 µl de chaque fraction est séparé sur un gel d'agarose 0,7% pour vérifier la digestion. On ajoute dans chaque fraction 1 µl d'un mélange contenant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. On incube les fractions 5 minutes à 37°C, puis on ajoute 1 µl d'un mélange des 4 désoxynucléosides triphosphates (dNTP) et on prolonge l'incubation de 10 minutes: les extrémités des fragments délétés sont rendues droites. On ajoute ensuite dans chaque fraction 40 µl d'un mélange contenant de la "T4 DNA ligase". Après une nuit d'incubation à température ambiante, on utilise 10 µl de chaque fraction pour

transformer 100 µl de bactéries DH5αF'IQ (Annexe VI, GIBCO-BRL) compétentes[#]. Le mélange de transformation est incubé 30 minutes dans un mélange eau - glace et 45 secondes à 43,5°C. Il est alors dilué avec 1 ml de LB et incubé une heure à 37°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées, resuspendues dans 100 µl de LB et étalées sur des boîtes contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Deux colonies ont été analysées pour chaque fraction.

La même procédure a permis d'obtenir des sous-clones à partir de 5 µg d'ADN du clone ExoIII 17b digéré par les enzymes BamHI et SphI et traité avec 500 U d'exonucléase III à 30°C.

8. SEQUENÇAGE

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées par la méthode de Sanger (Sanger et al. 1977; Sanger & Coulson 1978) qui est basée sur l'utilisation de di-désoxynucléotides. Les réactions de séquence se font sur de l'ADN simple-brin.

8.1 Préparation d'ADN simple-brin

A. A partir d'un phagemide

Le phage M13 est un phage filamenteux simple-brin de *E. coli* qui infecte les cellules mâles via le pilus sexuel codé par l'épisome F. Ce phage se réplique par un intermédiaire double-brin à partir duquel une centaine de molécules circulaires d'ADN simple-brin sont produites. Ces génomes viraux s'entourent de protéines et quittent la bactérie sans la lyser. Un phagemide est un plasmide qui contient une origine de replication du type M13 en plus de son origine de replication bactérienne. Ces phagemides se répliquent comme des plasmides normaux dans *E. coli*, sauf lorsque la

[#] Ces bactéries sont préparées à partir d'une culture dont la densité optique à 600 nm est égale à 1. Les bactéries sont incubées 10 minutes dans un mélange eau - glace, puis centrifugées et resuspendues dans 0,1 volume de CaCl₂ 0,1 M froid. Les bactéries sont incubées une seconde fois 30 minutes dans un mélange eau - glace, puis centrifugées et resuspendues dans 0,01 volume d'un mélange froid de CaCl₂ 0,1 M - glycérol (85/15). Les bactéries sont ensuite distribuées par 100 µl dans des eppendorfs qui sont

bactérie hôte est infectée par un bactériophage "auxiliaire", tel que M13K07, qui fournit les protéines nécessaires au cycle viral et à l'encapsidation de l'ADN simple-brin. Ce bactériophage code la résistance à la kanamycine.

Pour la production d'ADN simple brin à partir d'un phagemide recombinant, on inocule un tube falcon de 50 ml contenant 10 ml de LB, de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la kanamycine (75 µg/ml) avec 100 µl d'une culture bactérienne à saturation et 10^{11} particules de phage M13K07. Après une nuit d'agitation à 37°C, les bactéries sont éliminées par centrifugation et les particules de phage présentes dans 1 ml de surnageant sont précipitées avec 250 µl d'une solution contenant 20% de polyéthylène glycol et 2 M NaCl dans du SM. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et 10 minutes de centrifugation à 14.000 g, les phages sont resuspendus dans 100 µl de TE. La suspension est extraite 1 fois au phénol et 1 fois au chloroforme. L'ADN est précipité à l'éthanol absolu et est resuspendu dans 20 µl d'eau.

B. Dénaturation d'ADN double-brin

La concentration d'ADN est ajustée de façon à avoir 2 µg d'ADN double-brin dans 8 µl. 2 µl de NaOH 2 M sont ajoutés à cet ADN. Après 2 minutes d'incubation à température ambiante, la solution est neutralisée avec 3 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8) et 7 µl d'eau. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol absolu et est resuspendu dans 10 µl d'eau.

8.2 Séquençage

Les réactions de séquence ont été réalisées avec un kit utilisant une ADN polymérase recombinante du phage T7 (Pharmacia, T7 Sequencing Kit). Le protocole proposé par la firme a été suivi en utilisant du [α - 35 S]dATP (Amersham, >1.000 Ci/mmol). Les produits des réactions de séquence ont été fractionnés sur gel de polyacrylamide 6% en conditions dénaturantes: 57 mg/ml d'acrylamide, 3 mg/ml de N,N'-méthylènebisacrylamide, 0,42 g/ml d'urée, 0,8 mg/ml de persulfate d'ammonium et 0,05% de N,N,N',N'-tétraméthylethylènediamine (TEMED) dans un tampon TBE 1x (90 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Un appareil de type "Macrophor Sequencing System" (Pharmacia-LKB) a été utilisé: la plaque thermostatique est traitée avec une

immédiatement plongés dans de l'azote liquide et conservés ensuite à -70°C. Avant l'utilisation, les bactéries sont diluées avec 900 µl de CaCl₂ 0,1 M froid.

solution de dichlorodiméthylsilane à 2% dans 1,1,1-trichloroéthane ("repel silane") et la plaque en verre adhérent au gel est traitée avec une solution de γ -méthacrylopropyltriméthoxysilane ("bind silane") diluée à 2% dans un mélange d'éthanol - eau - acide acétique (40/9/1). Après électrophorèse (50 W constant, 2,5 KV, 55°C), les gels sont fixés dans une solution d'acide acétique 10%, séchés et autoradiographiés (films Kodak, X-OMAT AR - 165 1512).

8.3 Comparaison de séquences

Les recherches d'homologies dans les banques de données GenBank et EMBL ont été faites avec les programmes BLASTN et TBLASTN en utilisant le serveur NCBI.

Les alignements de séquences d'ADN ou de protéines ont été réalisés avec le programme GeneWorks (IntelliGenetics). Pour l'ADN, les paramètres suivants ont été utilisés: 30 pour le coût d'ouverture d'espace, 2 pour le coût d'allongement d'espace, 10 pour la longueur minimale de la diagonale et 4.000 pour le décalage maximum de diagonale. Pour les protéines, les paramètres étaient respectivement de 2, 20, 4 et 20.

9. NORTHERN BLOT

9.1 Extraction d'ARN

L'ARN total des cellules en culture a été extrait d'après une méthode décrite par Davis et al. (1986). Les cellules sont lavées dans un tampon PBS et sont lysées dans une solution contenant du thiocyanate de guanidine (4 M), de l'acétate de sodium (25 mM) et du β -mercaptoethanol (120 mM). Le thiocyanate de guanidine est un agent dénaturant qui désintègre les structures cellulaires et inhibe l'activité des ribonucléases. On casse ensuite l'ADN génomique en passant le lysat à l'homogénéiseur (ultra-Turrax T25; Janke & Kunkel) et à travers une aiguille 21G. On dépose 8 ml du lysat sur 4 ml de CsCl 5,7 M dans des tubes (Beckman Ultra Clear 14x95 mm, 344060). Après une centrifugation de 18 heures à 182.000 g et à 20°C (rotor Beckman SW40 Ti, 32.000 rpm), l'ARN est passé au travers de la solution de CsCl contrairement à l'ADN qui est à l'interface et aux protéines qui sont dans la solution contenant du thiocyanate de guanidine. L'ARN est resuspendu dans 300 μ l d'eau, extrait 1 fois au phénol - chloroforme, 1 fois au chloroforme et précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation,

l'ARN est resuspendu dans de l'eau et on calcule sa concentration en sachant qu'une densité optique de 1 à 260 nm correspond à 40 µg/ml.

9.2 Marquage de la sonde

Le kit "Megaprime DNA labelling systems" de Amersham a été utilisé pour marquer ~25 ng du fragment de 1,57 kb SalI-SalI avec du [α -³²P]dCTP. Les nucléotides marqués et les amorces non incorporés ont été éliminés par une chromatographie d'exclusion sur une colonne de résine sépharose CL-6B (Pharmacia-LKB). La sonde et de l'ADN de sperme de saumon (100 µg/ml de solution d'hybridation) sont dénaturés par chauffage (5 minutes dans de l'eau bouillante).

9.3 Préparation et hybridation d'un Northern blot

L'ARN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, bromure d'éthidium 0,5 µg/ml et formaldéhyde 2% dans du tampon MOPS (MOPS 20 mM, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1mM). Après 2 heures de migration (7,5 V/cm), le gel est rincé 2 fois 20 minutes dans du SSC 10x et l'ARN est transféré durant la nuit sur une feuille de nitrocellulose avec une solution SSC 10x. Le filtre est séché et cuit 2 heures à 80°C sous vide. Le filtre est ensuite préhybridé 15 minutes à 60°C dans une solution sulfate de dextran 10%, SDS 1%, NaCl 1M (50 µl de solution par cm² de filtre). La sonde et de l'ADN de sperme de saumon dénaturés sont ensuite ajoutés à la solution de préhybridation et le filtre est hybridé à 60°C pendant la nuit. La nitrocellulose est lavée 2 fois 5 minutes à température ambiante dans une solution SSC 2x et 2 fois 15 minutes à 60°C dans une solution SSC 2x et SDS 1%, puis séchée et autoradiographiée.

10. REACTIONS DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)

Les PCR ont été réalisées dans une machine "TRIO-Thermoblock" de Biométra (Westburg).

10.1 Amplification d'ADNc

A. Transcription inverse à partir d'ARN total

La réaction se fait sur 2 µg d'ARN total dans 20 µl contenant: 4 µl de tampon de transcriptase inverse 5x (GIBCO-BRL), 4 µl d'un mix des 4 dNTPs à 2,5 mM chacun, 2 µl d'une solution de dithiotréitol à 100 mM (GIBCO-BRL), 1 µl d'oligo dT à 40 µM, 0,5 µl de RNAsine à 40 U/µl (Promega), 1 µl transcriptase inverse du M-MLV à 200 U/µl (GIBCO-BRL), l'ARN et de l'eau. Le mélange est incubé pendant 45 minutes à 42°C, puis est dilué avec 80 µl d'eau et est conservé à -20°C.

B. Amplification spécifique d'un ADNc

La PCR est effectuée à partir de 10 µl d'ADNc simple brin auxquels on ajoute 8 µl du mélange des 4 dNTP à 2,5 mM chacun, 10 µl de tampon PCR 10x (KCl 500 mM et Tris 100 mM (pH 8,3)), 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de chaque amorce spécifique 80 µM, 0,5 µl de Taq polymérase à 5 U/µl (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus) et 63,5 µl d'eau. Les amorces utilisées: 5'-GCC GAA ACC CGG GAC GAG-3' (sens) et 5'-CCC AAC ATC TCC CCC TAT CCT TT-3' (anti-sens) sont complémentaires de séquences situées respectivement en aval du 5'LTR et en amont du 3'LTR de l'élément LEC-A IAP. Les conditions d'amplification sont les suivantes:

<u>première dénaturation</u>	4 min à 94°C
<u>amplification</u>	30 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 65°C, 2 min à 72°C
<u>extension finale</u>	15 min à 72°C

C. Clonage du produit PCR

Un échantillon (20 µl) du produit d'amplification a été extrait une fois au phénol - chloroforme et une fois au chloroforme. Après précipitation à l'éthanol et centrifugation, l'ADN a été resuspendu dans 22 µl d'eau, 5 µl de tampon contenant du Tris 500 mM (pH 8), du MgCl₂ 100 mM, du DTT 50 mM et de l'ATP 5 mM, 20 µl du mélange des 4 dNTP à 1,25 mM chacun, 2 µl d'ADN polymérase du bactériophage T4 à 5 U/µl (Pharmacia) et 1 µl de polynucléotide kinase du bactériophage T4 à 10 U/µl (Biolabs). Ces enzymes sont utilisés respectivement pour rendre les extrémités des fragments droites et pour les phosphoryler. Après une incubation de 30 minutes à 37°C et une incubation de 10 minutes à 70°C, le mélange est séparé sur un gel de "low melting agarose" 2%. L'ADN est ensuite récupéré selon la procédure décrite à la section

IV.5.1B et est ligué dans le plasmide pTZ19R (Annexe V) clivé par HincII et déphosphorylé.

10.2 Amplification d'ADN plasmidique

Les fragments PCR de 105, 120 et 108 pb correspondant aux positions 699-797, 762-875 et 852-953 de l'élément LEC-A IAP ont été générés pour identifier avec précision la région codant l'antigène LEC-A. Ils ont été obtenus à partir de 100 ng du fragment XbaI-EcoRI de 268 pb cloné dans le plasmide pSVK3 (Annexe V, Pharmacia) et respectivement avec les oligonucléotides 5'-aag gat cca tgG ATG AAA TTC AGG ACA AGC TAT CAG AAG-3' et 5'-aag aat tcc taG GGT TCA AGA CCC TTG GAA AGG-3', avec les oligonucléotides 5'-aag gat cca tgG GTA AGT ATA CAG GCC TTT CCA AG-3' et 5'-aag aat tct caA TCT TTT TTC TTC TCC CTT TTT CCT C-3' et avec les oligonucléotides 5'-aag gat cca tgG GAA AAA GGG AGA AGA AAA AAG ATC G-3' et 5'-aag aat tct taA TCT GCT TCA GAA CTA CTA AGA GCT-3'. Ces amorces contiennent un site de restriction BamHI ou EcoRI, un codon ATG ou un codon STOP et des séquences complémentaires aux séquences de l'élément LEC-A IAP (majuscules). Les amplifications ont été effectuées avec la Taq polymérase dans les conditions suivantes:

<u>première dénaturation</u>	4 min à 94°C
<u>amplification</u>	20 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 58°C, 2 min à 72°C
<u>extension finale</u>	15 min à 72°C

Les produits PCR ont été extraits 1 fois au chloroforme. Les amorces non incorporées ont été éliminées par passage sur colonne PrimErase Quik (Stratagène). Les fragments ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI et clonés dans le vecteur pcDNAI/Amp (Invitrogen). Les fragments ont ensuite été sous-clonés dans les sites KpnI et EcoRI du plasmide pSVK6.4. Ce plasmide a été obtenu à partir du vecteur pSVK3 en deux étapes. Dans la première étape, le vecteur a été clivé par l'enzyme de restriction EcoRI, traité avec le fragment de Klenow et circularisé: il ne contient plus de site EcoRI. Au cours de la deuxième étape, un site EcoRI a été introduit dans le vecteur en clonant une paire d'oligonucléotides 5'-GGA ATT CC-3' (Pharmacia) dans le site XhoI dont les extrémités ont été rendues droites par traitement avec le fragment de Klenow.

10.3 Amplification d'ADN génomique

Les amplifications ont été réalisées sur 100 ng d'ADN génomique avec les oligonucléotides suivants: (1) 5'-TGG TTA ACG GGT CAG ACA TGA-3' (élément LEC-A IAP: positions -22 à -2, sens), (2) 5'-GGA AAG GCC TGT ATA CTT ACC T-3' (positions 782-760, anti-sens), (3) 5'-CGT GGG AAT CCT CTG AAG GG-3' (positions 2796-2815, sens) (4) 5'-CAA TCA GCA CCA TGA GGA CAG C-3' (positions 4473-4452, anti-sens) et des oligonucléotides situés aux extrémités de l'exon 2 du gène P1A (Lethé et al. 1992). Les réactions ont été effectuées dans 50 µl contenant: 10 µl d'ADN, 4 µl du mélange des 4 dNTP à 2,5 M chacun, 5 µl de tampon PCR 10x (Finnzymes), 0,5 µl de chaque amorce spécifique 80 µM, 0,63 µl Dynasyme à 2 U/µl (Finnzymes) et 29,37 µl d'eau.

Les amplifications ont été réalisées dans les conditions suivantes:

première dénaturation 5 min à 94°C

amplification

40 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 60°C, 2 min à 72°C pour les oligonucléotides (1) et (2)

40 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 65°C, 2 min à 72°C pour les oligonucléotides (3) et (4)

40 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 62°C, 2 min à 72°C pour les oligonucléotides (1) et (4)

40 cycles: 1 min à 94°, 2 min à 62°C, 2 min à 72°C pour l'exon 2 du gène P1A

extension finale 15 min à 72°C

10 µl de chaque réaction sont ensuite analysés sur gel d'agarose.

11. SOUTHERN BLOT

De l'ADN génomique (~20 µg) a été incubé pendant 20 heures à 37°C avec 120 U d'enzyme de restriction BamHI ou HindIII (l'enzyme est ajouté en 2 fois) de façon à obtenir une digestion totale. Après une extraction au phénol - chloroforme - alcool isoamylique, l'ADN est précipité à l'éthanol absolu et est resuspendu dans 25 µl de TE. Un échantillon de 2,5 µl est séparé pendant 3 à 4 heures à 2,3 V/cm sur un gel d'agarose (0,5 à 0,6%) pour vérifier la digestion et pour comparer la quantité d'ADN dans les différents échantillons. La quantité d'ADN des différents échantillons est éventuellement ajustée et l'ADN est séparé pendant 16 heures à 1,4 V/cm sur un gel d'agarose (0,5 à 0,6%). La procédure détaillée à la section IV.II.6 est utilisée pour dénaturer et transférer l'ADN sur une feuille de nitrocellulose. Après une

préhybridation de 4 heures à 65°C (voir IV.II.6), les filtres sont transférés dans la solution d'hybridation (SSC 3,5x, Denhardt 1x, NaH₂PO₄ 25 mM (pH 7), SDS 0,5%, EDTA 2 mM; 50 µl de solution par cm² de filtre) contenant la sonde (voir IV.II.9.2) et incubés durant la nuit à 65°C. Ils sont ensuite lavés à 65°C: 3 à 4 fois 30 minutes dans une solution SSC 2x et SDS 0,5%, puis 1 fois 30 minutes dans une solution SSC 0,2x et SDS 0,1% et 1 fois 30 minutes dans une solution SSC 0,1x et SDS 0,1%. Les filtres sont ensuite séchés et autoradiographiés.

V. ANNEXE I

Annexe I: Alignement des séquences d'un élément IAP ayant activé le gène codant l'IL-3 (Ymer et al. 1986), de l'élément IAP MIA14 (Mietz et al. 1987), de l'élément IAP L31 (Aota et al. 1987), et de l'élément IAP codant l'antigène LEC-A.

L'alignement a été réalisé avec le programme GeneWorks. Les points signifient que la séquence est identique au consensus. Les traits correspondent aux espaces introduits pour un alignement optimal des séquences. Les boîtes indiquent les identités de séquences.

Les LTR et les régions *gag*, *pro*, *pol* et *env* des différents éléments sont encadrés en gras. Les domaines de la protéine *gag-pro* codée par l'élément MIA14 sont indiqués (lignes hachurées). Le début du clone ExoIII 17b est représenté. La région de l'élément LEC-A IAP codant le peptide antigénique est localisée par une boîte grise. La séquence de l'élément MIA14 qui pourrait être responsable d'un changement de phase au cours de la traduction est soulignée en gras (fin de la région *pro*).

IL3	C.....C.....G...A...ATC.TA	100
MIA14	G.....G.....GGT.CT	99
L31	G.....G.....ATC.TA	99
LEC-A	G.....G.....ATC.TA	99
Consensus	TGTTGGAGC CGCSCCACA TTGCCCTTA CAAGATGGC CTGACATCT GTGTTCTAAG TGGTAAACAA ATAATCTGG CATRGGCRA GGCTRYTYW	100
IL3	TG...A.T.....G...G.G...TG...T...	199
MIA14	CT...C.A.....T.....AT.T...CT...A...	199
L31	TG...A.T.....G...G.G...TG...T...	198
LEC-A	TG...A.T.....G...G.G...TG...T...	198
Consensus	YKACTMCTG TGCCTGCTC TCCCGTGAC GTCAACTCG CCGATGGCT GCAGCCANTC AGGAGCTGAC ACCTCCAGG CGAARKAKAA YKCTCTTAWA	200
IL3	TCC.....G.T.....T.....	282
MIA14	CGT.....A.A.....C.....C.....	283
L31	CGT.....G.T.....C.....A.....	15
LEC-A	CGT.....G.T.....C.....A.....	298
Consensus	ARAGGGAGG GGTPTYSKT TTCTCTCT CTGCTTCT RCWCTTTGC TTCTGCACC CTGGVCTCTG AAGATCTAAG MAATAGAT TTGCCGAGA	300
IL3		381
MIA14		383
L31		314
LEC-A		397
Consensus	ACATTCTCT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT	400
IL3		481
MIA14		483
L31		214
LEC-A		497
Consensus	BAGGAGATG CTTCTTCCA GAACGAGAC TCCGCTGTC GGTAAATAG GTTCCGTAA AGGAGCTGT TAAGAAGAT TCACTGTAT GAATTCAGAA	500
IL3		581
MIA14		583
L31		314
LEC-A		597
Consensus	CTTTTCACT GGGGAGGAG AGTACAGT AGTAAGCT TACAGGTAA GCTCTCTT GAATCTTA AGAATTCAG AGAGCTTA TTAGAGTAA	600
IL3		679
MIA14		683
L31		412
LEC-A		695
Consensus	ACATGAGAT AGGATGCTG TTAGAATCT TCTCTCTT GAGGCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT	700
IL3		767
MIA14		782
L31		511
LEC-A		782
Consensus	GAATTCAGC ACAAGCTAT CAGAGTAA CCGGAGAG AGAGTAGG TTAGAGTAA ATATGCTAC TTAGAGTAA ATATGCTAC TTAGAGTAA	800
IL3		867
MIA14		882
L31		611
LEC-A		882
Consensus	CTTTTCACT GGGGAGGAG AGTACAGT AGTAAGCT TACAGGTAA GCTCTCTT GAATCTTA AGAATTCAG AGAGCTTA TTAGAGTAA	900
IL3		958
MIA14		982
L31		710
LEC-A		973
Consensus	TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT	1000
IL3		1031
MIA14		1079
L31		807
LEC-A		1046
Consensus	TGGGAGGAG CAAGCAGCT ATTAAGTAA AAAAGGTAC CAGCAGGTA AAGTCTAGC TAAATCTTA AGAATTCAG CAAAGCTTC TGGGAGG	1100
IL3		1108
MIA14		1158
L31		884
LEC-A		1146
Consensus	SEPTCTCT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT TCTCTCTT	1200
IL3		1195
MIA14		1258
L31		968
LEC-A		1246
Consensus	MTCTCCAGA GAGGAGCTG GCAATGCTG AGTCCGAGA CTCATTCAT CCGGAGAG AACAAAGGAA AATCAACAG GCATTCTG TTTTCTAGG	1300
IL3		1271
MIA14		1358
L31		1066
LEC-A		1346
Consensus	AGCGAGGCT GGGGAGCTG AMSCTCCGT AGAATAATK CAACTAAG ARMTCCGA GTCCGCTCTT AATAAGAA CAATGCTTA TTTTCTAGG	1400

5'LTR

domaine N-terminal

régions gag et pro

domaine CA

domain PR

IL3	T.....TA...GTG.TG.C TGCTG.....	2857
MIA14	C.....CT...AGT.GT.G CTGCT.....	4852
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	YGGGAATGA TTGGCAGAT AAGGCCACTW AAREKREKGS YKSYKCCCTA TCATCCCCGG TAGAGGCTGC CCAAGAAATT TTCATAACAA CTTTTCATGT	4900
IL3	ACA.TA.....TTT.....	2957
MIA14	CAT.AC.....AAA.....	4952
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	GACGGCTGAA HSNWMCACA GTGOWMCTC CTGACAAGA AAAGAAGCCC GTGACATTGT TACTCAATGT CAAAGCTGCT GTGAGTCTTT GCCAGTCTCT	5000
IL3		3057
MIA14		5052
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	CATGTGGGAA TTAACCCAGC CGGTATTGCA CCTCTACAGG TCTGGCAAAAT GGATGTATCA CATGTTCTCT CCTTTGGAAA ACTTCAATAT CTCCTATGCT	5100
IL3	T.....	3157
MIA14	C.....	5152
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	CCATGTACAC AATGTTCTGC ATCATGTTTG CTCTCTCGTT AACYGAGAAA AAAGCCTCAC ATGTGATTCA ACATTGTCTT GAGGCATGGA GTGCTTGSGG	5200
IL3	G.....G.....C.....A.....	3257
MIA14	A.....A.....T.....G.....	5252
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	RAAACCAGA CTCCTTAAGA CTGATAATGG ACCAGCTTAT ACPTCTCAAA AATTTCAGCA GTTCTGCCGT CAGATGGAGC TRACCCACCT GACTGGACTT	5300
IL3	G.....G.....ACTTTT.....C.G.AC	3357
MIA14	A.....A.....TTGGAA.....A.T.TA	5348
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	CCATACACC CTCAGGACA GGTATTGTT GAGCTGGCG ATGCACCCCT CAJAACCTAT CTTATAAAC AGAAGAGGGR AMYKKNWAG GAGAMTGNW	5400
IL3	...G.....T.....G.....T.....C.....T.....	3457
MIA14	...C.....A.....T.....A.....A.....	5446
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	CCCSAGACC AAGAGWTCG GTKCTWGG CACTCTTAC ACTCAATTT TTAATATTG ATGTCATGG CCATCTGCG GCTGAACGTC AWTGTCAGA	5500
IL3	G.....C.....TA.....	3557
MIA14	C.....T.....GG.....	5546
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	GCCAGATAGG CCAATGAGA TGGTAAATG GAJAAATGTC CTTSATAATA AATGGTATGG CCCGATCCT ATYTTGATAA GATCCAGGGG AGCRRCTGT	5600
IL3	G.....T...ATGT...CTGTC...	3655
MIA14	A.....C...TGTC...TCGTCT...	5645
L31		2633
LEC-A		2919
Consensus	GTITTCACC AGAATGAAGA CAACCCATT TGGTACCAG AAAGACTCAC CGAATAATC CAGACTGACC AAGGGAATAC YTGAWKYYCC YSKYVYTG	5700
IL3	G.....A.C GTT...PA.....	3751
MIA14	A.....C.T TCG...AC.....	5745
L31		2689
LEC-A		2973
Consensus	TGATGTCAG GCGGTCAAT AATAARAGA GAGCCAGMY EYGGGGH AATGTCGA TTTCCACTCC CAATCAGCT GATCTATAAT GCTCAACTAT	5800
IL3	CT.....CA.....	3851
MIA14	CT.....CG.....	5845
L31		2787
LEC-A		3073
Consensus	TGCTGCTT TTATA CACT AACT GGAAC TGSGTTEC CTTAATTAG ACAGCTTGG CTCTPTTGG ACAGGTCCAG ATRACTGACA CCATTACAC	5900
IL3	G.....G.....	3950
MIA14		5945
L31		2886
LEC-A		3172
Consensus	TTTTCACCC CTAGTGACTA CAGTCATAGA TACACAGGCC TCAGCTAATG TCAATATACA GAGAGTGTG ATGTGCTTA ATCAACTCA TACTCTTGT	6000
IL3		4050
MIA14		6044
L31		2985
LEC-A		3271
Consensus	CCAGTACAA CTAGATGTAT TATGACAAAT AACTCAGC GGGCTTAC AAAAGTTCC GATATGTGT GTTAATCCA TTCAGTATGT TAATTTTAC	6100
IL3	AGAT.....	4148
MIA14	GATC.....	6144
L31		3084
LEC-A		3370
Consensus	TAGGCGAGCT AATTGTCAA AAAGCTTTT TCAGTATATG TTACAGAAAT GGAAGCTGA ATTGAACCA RRWTTTCGG GAATGAGAC TTCAGTCAA	6200
IL3	AGCA.....TCT.....	4248
MIA14	AGCA.....TCT.....	6244
L31		3183
LEC-A		3469
Consensus	CTCCAGGCC TTGACCTGT CTGACCAA AGGATTACC AATTGGATCT CCTGRRSH TTYTHYHT RAAAAHGG CTGGGATTA TATTATTGG	6300
IL3		4348
MIA14		6344
L31		3283
LEC-A		3569
Consensus	AGATACACTT TGTGTTGAT TATGTTGCT TCTGTATG GTCTATAGS TTAAGGCCA AACTAGGAGA GACAAGGTGG TTATTGCCA GGCTTTCA	6400
IL3		4442
MIA14		6438
L31		3383
LEC-A		3663
Consensus	GGACTAGAC ATGGAGCTC CCTGATAA TGGTATTA TCTTAGGCA ATAGGTGCTT GGCACCTAG CTCTTAATC TCAAGGCT AGCTCATG	6500

région pol

région env

3'LTR

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Aota, S., T. Gojobori, K. Shigesada, H. Ozeki and T. Ikemura (1987). "Nucleotide sequence and molecular evolution of mouse retrovirus-like IAP elements." *Gene* 56: 1-12.
- Arnold, B., H. G. Burgert, A. L. Archibald and S. Kvist (1984). "Complete nucleotide sequence of the H-2K^k gene. Comparison of three H-2^K locus alleles." *Nucleic Acids Res.* 12: 9473-9487.
- Asch, B. B., H. L. Asch, D. L. Stoler and G. R. Anderson (1993). "De-regulation of endogenous retrotransposons in mouse mammary carcinomas of diverse etiologies." *Int. J. Cancer* 54: 813-819.
- Atherton, E., C. J. Logan and R. C. Sheppard (1981). "Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid phase synthesis using N α -fluorenylmethoxycarbonylamino-acid on polymide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide." *J. Chem. Soc. Lond. Perkin Trans. 1*: 538.
- Basombrio, M. A. (1970). "Search for common antigenicity among twenty-five sarcomas induced by methylcholanthrene." *Cancer Res.* 30: 2458-2462.
- Bates, P. F. and R. A. Swift (1983). "Double cos site vectors : simplified cosmid cloning." *Gene* 26: 137-146.
- Bernard, H.-U., G. Krämmer and W. G. Röwekamp (1985). "Construction of a fusion gene that confers resistance against hygromycin B to mammalian cells in culture." *Exp. Cell. Res.* 158: 237.
- Beyaert, R., B. Vanhaesebroeck, P. Suffys, F. Van Roy and W. Fiers (1989). "Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9494-9498.
- Biddison, W. E. and J. C. Palmer (1977). "Development of tumor cell resistance to syngeneic cell-mediated cytotoxicity during growth of ascitic mastocytoma P815Y." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 329-333.
- Blankenstein, T., Z. Qin, W. Li and T. Diamantstein (1990). "DNA rearrangement and constitutive expression of the interleukin 6 gene in a mouse plasmacytoma." *J. Exp. Med.* 171: 965-970.
- Blin, N. and D. Stafford (1976). "A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes." *Nucl. Acids Res.* 3: 2303.
- Boon, T., J. Van Snick, A. Van Pel, C. Uyttenhove and M. Marchand (1980). "Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. II. T lymphocyte mediated cytotoxicity." *J. Exp. Med.* 152: 1184-1193.
- Boon, T. and A. Van Pel (1989). "T cell recognized antigenic peptides derived from the cellular genome are not protein degradation products but can be generated directly by transcription and translation of short subgenic regions. A hypothesis." *Immunogenetics* 29: 75-79.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wölfel, C. Wölfel, E. De Plaen, B. Lethé, P. Coulie and T. Boon (1993). "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J. Exp. Med.* 178: 489-495.
- Brown, M. G., J. Driscoll and J. J. Monaco (1991). "Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes." *Nature* 353: 355-357.
- Brunner, K. T., H. R. MacDonald and J.-C. Cerottini (1980). "Antigenic specificity of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response to murine sarcoma virus-induced tumors. II. Analysis of the clonal progeny of CTL precursors stimulated *in vitro* with syngeneic tumor cells." *J. Immunol.* 124: 1627-1634.
- Cerottini, J.-C. and K. T. Brunner (1974). "Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity." *Adv. Immunol.* 18: 67-132.
- Chang, J. M., D. Metcalf, R. A. Lang, T. J. Gonda and G. R. Johnson (1989). "Nonneoplastic hematopoietic myeloproliferative syndrome induced by dysregulated multi-CSF (IL-3) expression." *Blood* 6: 1487-1497.
- Chen, L., P. McGowan, S. Ashe, J. Johnston, Y. Li, I. Hellström and K. E. Hellström (1994). "Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity." *J. Exp. Med.* 179: 523-532.

- Chomez, P., E. De Plaen, A. Van Pel, C. De Smet, J.-P. Szikora, C. Lurquin, A.-M. Lebacqz-Verheyden and T. Boon (1992). "Efficient expression of tum⁻ antigen P91A by transfected subgenomic fragments." *Immunogenetics* 35: 241-252.
- Christy, R. J., A. R. Brown, B. B. Gourlie and R. C. C. Huang (1985). "Nucleotide sequence of murine intracisternal A-particle gene LTRs have extreme variability within the R region." *Nucleic Acids res.* 13: 289-303.
- Christy, R. J. and R. C. C. Huang (1988). "Functional analysis of the long terminal repeats of intracisternal A-particle genes: sequences within the U3 region determine both the efficiency and direction of promoter activity." *Mol. Cell. Biol.* 8: 1093-1102.
- Corsaro, C. M. and M. L. Pearson (1981). "Competence for DNA transfer of ouabain resistance and thymidine kinase: clonal variation in mouse L-cell recipients" *Somat. Cell Genet.* 7: 617-630.
- Coulie, P. G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wölfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. De Plaen, C. Lurquin, J.-P. Szikora, J.-C. Renauld and T. Boon (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J. Exp. Med.* 180: 35-42.
- Cox, A. L., J. Skipper, Y. Chen, R. A. Henderson, T. L. Darrow, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt and C. L. Slingluff (1994). "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines." *Science* 264: 716-719.
- Davis, J. E. and P. Cresswell (1990). "Lack of detectable endocytosis of B lymphocyte MHC class II antigens using an antibody-independent technique." *J. Immunol.* 144: 990-997.
- Davis, L. G., M. D. Dibner and J. F. Battey (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. New York, Elsevier.
- de Bergeyck, V., E. De Plaen, P. Chomez, T. Boon and A. Van Pel (1994). "An intracisternal A-particle sequence codes for an antigen recognized by syngeneic cytolytic T lymphocytes on a mouse spontaneous leukemia." *Eur. J. Immunol.* 24: 2203-2212.
- De Plaen, E., C. Lurquin, A. Van Pel, B. Mariamé, J.-P. Szikora, T. Wölfel, C. Sibille, P. Chomez and T. Boon (1988). "Immunogenic (tum⁻) variants of mouse tumor P815 : Cloning of the gene of tum⁻ antigen P91A and identification of the tum⁻ mutation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2274-2278.
- Deverson, E. V., I. R. Gow, W. J. Coadwell, J. J. Monaco, G. W. Butcher and J. C. Howard (1990). "MCH class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters." *Nature* 348: 738-741.
- Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll and R. C. Mulligan (1993). "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539-3543.
- Dührsen, U., J. Stahl and N. M. Gough (1990). "In vivo transformation of factor-dependent hematopoietic cells: role of intracisternal A-particle transposition for growth factor gene activation." *EMBO J.* 9: 1087-1096.
- Dunn, T. B. and M. Potter (1957). "A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse." *J. Natl. Cancer Inst.* 18: 587-595.
- Engelhard, V. H. (1994). "Structure of peptides associated with MHC class I molecules." *Curr. Op. Immunol.* 6: 13-23.
- Espevik, T. and J. Nissen-Meyer (1986). "A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes." *J. Immunol. Methods* 95: 99-105.
- Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H.-G. Rammensee (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* 351: 290-296.
- Falzon, M. and E. L. Kuff (1990). "A variant binding sequence for transcription factor EBP-80 confers increased promoter activity on a retroviral long terminal repeat." *J. Biol. Chem.* 265: 13084-13090.
- Farrar, J. J., J. Fuller-Farrar, P. L. Simon, M. L. Hilfiker, B. M. Stadler and W. L. Farrar (1980). "Thymoma production of T cell growth factor (interleukin 2)." *J. of Immunol.* 125: 2555-2558.
- Fearon, E. R., D. M. Pardoll, T. Itaya, P. Golumbek, H. I. Levitsky, J. W. Simons, H. Karasuyama, B. Vogelstein and P. Frost (1990). "Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response." *Cell* 60: 397-403.

- Fetten, J. V., N. Roy and E. Gilboa (1991). "A frameshift mutation at the NH2 terminus of the nucleoprotein gene does not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitopes." *J. Immunol.* 147: 2697-2705.
- Frischauf, A.-M., H. Lehrach, A. Poustka and N. Murray (1983). "Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences." *J. Mol. Biol.* 170: 827-842.
- Galien, R., G. Mercier, M. Garcette and R. Emanoil-Ravier (1991). "RAS oncogene activates the intracisternal A particle long terminal repeat promoter through a c-AMP response element." *Oncogene* 6: 849-855.
- Galili, N., D. Naor, B. Asjo and G. Klein (1976). "Induction of immune responsiveness in a genetically low-responsive tumor-host combination by chemical modification of the immunogen." *Eur. J. Immunol.* 6: 473-476.
- Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethé, F. Brasseur and T. Boon (1994). "Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes." *J. Exp. Med.* 179: 921-930.
- Glynn, R., S. H. Powis, S. Beck, A. Kelly, L. A. Kerr and J. Trowsdale (1991). "A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC." *Nature* 353: 357-360.
- Graham, F. L. and A. J. Van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* 52: 456-467.
- Green, M. R. (1986). "Pre-mRNA splicing." *Ann. Rev. Genet.* 20: 671-708.
- Greenberg, P. D., J. P. Klarnet, D. E. Kern and M. A. Cheever (1988). "Therapy of disseminated tumors by adoptive transfer of specifically immune T cells." *Prog. Exp. Tumor Res.* 32: 104-127.
- Gross, L. (1943). "Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line." *Cancer Res.* 3: 326-333.
- Gross-Bellard, M., P. Oudet and P. Chambon (1973). "Isolation of high molecular-weight DNA from mammalian cell." *Eur. J. Biochem.* 36: 32.
- Grosveld, F. G., T. Lund, E. J. Murray, A. L. Mellor, H. H. M. Dahl and R. A. Flavell (1982). "The construction of cosmid libraries which can be used to transform eukaryotic cells." *Gene* 10: 6715-6732.
- Haeuptle, M.-T., N. Flint, N. M. Gough and B. Dobberstein (1989). "A tripartite structure of the signals that determine protein insertion into the endoplasmic reticulum membrane." *J. Cell. Biol.* 108: 1227-1236.
- Hawley, R. G., M. J. Schulman and N. Hozumi (1984). "Transposition of two different intracisternal A particle elements into an immunoglobulin kappa-chain gene." *Mol. Cell. Biol.* 4: 2565-2572.
- Heberlein, C., M. Kawai, M.-J. Franz, G. Beck-Engeser, C. P. Daniel, W. Ostertag and C. Stocking (1990). "Retrotransposons as mutagens in the induction of growth autonomy in hematopoietic cells." *Oncogene* 5: 1799-1807.
- Heidmann, O. and F. Rougeon (1982). "Multiple sequences related to a constant-region kappa light chain in the rabbit genome." *Cell* 28: 507-513.
- Heidmann, O. and T. Heidmann (1991). "Retrotransposition of a mouse IAP sequence tagged with an indicator gene." *Cell* 64: 159-170.
- Hérin, M., C. Lemoine, P. Weynants, F. Vessière, A. Van Pel, A. Knuth, R. Devos and T. Boon (1987). "Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma." *Int. J. Cancer* 39: 390-396.
- Hewitt, H. B., E. R. Blake and A. S. Walder (1976). "A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin." *Br. J. Cancer* 33: 241-259.
- Hirsch, H. H., A. P. K. Nair and C. Moroni (1993). "Suppressible and nonsuppressible autocrine mast cell tumors are distinguished by insertion of an endogenous retroviral element (IAP) into the IL-3 gene." *J. Exp. Med.* 178: 403-411.
- Hosken, N. A. and M. J. Bevan (1990). "Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules." *Science* 248: 367-370.
- Hsu, T. C. and D. J. Merchant (1961). "Mammalian chromosomes *in vitro*. XIV. Genotypic replacement in cell populations." *J. Natl. Cancer Inst.* 26: 1075-1081.

- Jacks, T., H. D. Madhani, F. R. Masiarz and H. E. Varmus (1988). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." *Cell* 55: 447-458.
- Jiang, D. and D. C. Flyer (1992). "Immune response to Moloney murine leukemia virus nonviral, tumor-associated antigens fail to provide *in vivo* tumor protection." *J. Immunol.* 148: 974-980.
- Kast, W. M., R. Offringa, P. J. Peters, A. C. Voordouw, R. H. Meloen, A. J. van der Eb and C. J. M. Melief (1989). "Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A specific cytotoxic T lymphocytes." *Cell* 59: 603-614.
- Keith, G. and G. Dirheimer (1978). "The primary structure of rabbit, calf and bovine liver tRNAPhe." *Biochem. Biophys. Acta* 517: 133-149.
- Kelly, A., S. H. Powis, R. Glynn, E. Radley, S. Beck and J. Trowsdale (1991). "Second proteasome-related gene in the human MHC class II region." *Nature* 353: 667-668.
- Kim, B. S. (1979). "Tumor-specific immunity induced by somatic hybrids. II. Elicitation of enhanced immunity against the parent plasmacytoma." *J. immunol.* 123: 739-744.
- Kit, S., D. R. Dubbs, L. J. Piekarski and T. C. Hsu (1963). "Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine." *Exp. Cell Res.* 31: 297-312.
- Klarnet, J. P., D. E. Kern, K. Okuno, C. Holt, F. Lilly and P. D. Greenberg (1989). "FBL-reactive CD8⁺ cytotoxic and CD4⁺ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens." *J. Exp. Med.* 169: 457-467.
- Kleijmeer, M. J., A. Kelly, H. J. Geuze, J. W. Slot, A. Townsend and J. Trowsdale (1992). "Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi." *Nature* 357: 342-344.
- Klein, E. and G. Klein (1964). "Antigenic properties of lymphomas induced by the Moloney agent." *J. Natl. Cancer Inst.* 32: 547-568.
- Klein, G., H. O. Sjögren, E. Klein and K. E. Hellström (1960). "Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host." *Cancer Res.* 20: 1561-1572.
- Kongsuwan, K., J. Allen and J. M. Adams (1989). "Expression of Hox-2.4 homeobox gene directed by proviral insertion in a myeloid leukemia." *Nucl. Acids Res.* 17: 1881-1892.
- Kono, T., T. Doi, G. Yamada, M. Hatakeyama, S. Minamoto, M. Tsudo, M. Miyasaka, T. Miyata and T. Taniguchi (1990). "Murine interleukin 2 receptor β chain: dysregulated gene expression in lymphoma line EL-4 caused by a promoter insertion." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1806-1810.
- Kripke, M. L. (1974). "Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light." *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1333-1336.
- Kripke, M. L. (1977). "Latency, histology, and antigenicity of tumors induced by ultraviolet light in three inbred mouse strains." *Cancer Res.* 37: 1395-1400.
- Kuff, E. L., K. K. Lueders, H. L. Ozer and N. A. Wivel (1972). "Some structural and antigenic properties of intracisternal A particles occurring in mouse tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 218-222.
- Kuff, E. L. and J. Fewell (1985). "Intracisternal A-particle gene expression in normal mouse thymus tissue: gene products and strain-related variability." *Mol. Cell. Biol.* 5: 474-483.
- Kuff, E. L., F. E. Fewell, K. K. Lueders, J. A. DiPaolo, S. C. Amsbaugh and N. C. Popescu (1986). "Chromosome distribution of intracisternal A-particle sequences in the Syrian hamster and mouse." *Chromosoma* 93: 213-219.
- Kuff, E. L. and K. K. Lueders (1988). "The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects." *Adv. Cancer Res.* 51: 183-276.
- Leclerc, J. C., E. Gomard, F. Plata and J. P. Levy (1973). "Cell-mediated immune reaction against tumors induced by oncornaviruses. II. Nature of the effector cells in tumor-cell cytotoxicity." *Int. J. Cancer* 11: 426-432.
- Leib-Mösch, C., R. Brack-Werner, T. Werner, M. Bachmann, O. Faff, V. Erfle and R. Hehlmann (1990). "Endogenous retroviral elements in human DNA." *Cancer Research (Suppl.)* 50: 5636-5642.
- Leiter, E. H. and E. L. Kuff (1984). "Immunocytochemical demonstration of increases antigen (p73) in genetically diabetic mice." *Am. J. Pathol.* 114: 46-55.

- Lepage, P., A. Devault and P. Gros (1993). "Activation of the mouse *mdr3* gene by insertion of retroviruses in the multidrug-resistant P388 tumor cells." *Mol. Cell. Biol.* 13: 7380-7392.
- Leslie, K. B., F. Lee and J. W. Schrader (1991). "Intracisternal A-type particle mediated activation of cytokine genes in a murine myelomonocytic leukemia: generation of functional cytokine mRNAs by retroviral splicing events." *Mol. Cell. Biol.* 11: 5562-5570.
- Lethé, B., B. Van den Eynde, A. Van Pel, G. Corradin and T. Boon (1992). "Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B : two epitopes carried by a single peptide." *Eur. J. Immunol.* 22: 2283-2288.
- Ljunggren, H. G., N. J. Stam, C. Öhlen, J. J. Neefjes, P. Höglund, M. T. Heemels, J. Bastin, T. N. M. Schumacher, A. Townsend, K. Kärre and H. L. Ploegh (1990). "Empty MHC class I molecules come out in the cold." *Nature* 346: 476-480.
- Lueders, K. K. and E. L. Kuff (1977). "Sequences associated with intracisternal A particles are reiterated in the mouse genome." *Cell* 12: 963-972.
- Lueders, K. K. and E. L. Kuff (1980). "Intracisternal A-particle genes: identification in the genome of *Mus musculus* and comparison of multiple isolates from a mouse gene library." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3571-3575.
- Lueders, K. K. and E. L. Kuff (1981). "Sequences homologous to retrovirus-like genes of the mouse are present in multiple copies in the Syrian hamster genome." *Nucleic Acids Res.* 22: 5917-5930.
- Lueders, K. K., J. W. Fewell, E. D. Kuff and T. Koch (1984). "The long terminal repeat of an endogenous intracisternal A-particle gene functions as a promoter when introduced into eucaryotic cells by transfection." *Mol. Cell. Biol.* 4: 2128-2135.
- Lurquin, C., A. Van Pel, B. Mariamé, E. De Plaen, J.-P. Szikora, C. Janssens, M. Reddehase, J. Lejeune and T. Boon (1989). "Structure of the gene of tumor transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with L^d by cytolytic T cells." *Cell* 58: 293-303.
- Madden, D. R., J. C. Gorga, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1992). "The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC." *Cell* 70: 1035-1048.
- Margulies, D. H., G. A. Evans, K. Ozato, R. D. Camerini-Otero, K. Tanaka, E. Appella and J. G. Seidman (1983). "Expression of $H-2D^d$ and $H-2L^d$ mouse major histocompatibility antigen genes in L cells after DNA-mediated gene transfer." *J. Immunol.* 130: 463-470.
- Martinez, C. K. and J. J. Monaco (1991). "Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene." *Nature* 353: 664-667.
- Maryanski, J. L., J. Van Snick, J. C. Cerottini and T. Boon (1982). "Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. III. Clonal analysis of the syngeneic cytolytic T lymphocyte response." *Eur. J. Immunol.* 12: 401-406.
- Maryanski, J. L. and T. Boon (1982). "Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. IV. Analysis of variant-specific antigens by selection of antigen-loss variants with cytolytic T cell clones." *Eur. J. Immunol.* 12: 406-412.
- Maryanski, J. L., P. Pala, G. Corradin, B. R. Jordan and J. C. Cerottini (1986). "H-2 restricted cytolytic T cells specific for HLA can recognize a synthetic HLA peptide." *Nature* 324: 578-579.
- Mietz, J. A., Z. Grossman, K. K. Lueders and E. L. Kuff (1987). "Nucleotide sequence of a complete mouse intracisternal A-particle genome: relationship to known aspect of particle assembly and function." *J. of Virol.* 61: 3020-3029.
- Monaco, J. J. and H. O. McDevitt (1982). "Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3001-3005.
- Monaco, J. J., S. Cho and M. Attaya (1990). "Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing." *Science* 250: 1723-1726.
- Nair, A. P. K., I. D. Diamantis, J.-F. Conscience, V. Kindler, P. Hofer and C. Moroni (1989). "A v-H-ras-dependent hemopoietic tumor model involving progression from a clonal stage of transformation competence to autocrine interleukin 3 production." *Molec. Cell. Biol.* 9: 1183-1190.
- Nicolas, J. F. and P. Berg (1983). "Regulation of expression of genes transduced into embryonal carcinoma cells." *CSH Conferences Cell Prolif.* 10: 469-485.

Ortiz-Navarrete, V., A. Seelig, M. Gernold, S. Frentzel, P. M. Kloetzel and G. J. Hämmerling (1991). "Subunit of the "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex." *Nature* 353: 662-664.

Pellicer A., D. Robins, B. Wold, R. Sweet, J. Jackson, I. Lowy, J.M. Roberts, G.K. Sim, S. Silverstein and R. Axel (1980). "Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer." *Science* 209: 1414-1422.

Perkins, A., K. Kongsuwan, J. Visvader, J. M. Adams and S. Cory (1990). "Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicit myeloid leukemia." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8398-8402.

Perkins, A. C. and S. Cory (1993). "Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene." *EMBO J.* 12: 3835-3846.

Perucho, M., D. Hanahan and M. Wigler (1980). "Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells." *Cell* 22: 309-317.

Plata, F., J.-C. Cerottini and K. T. Brunner (1975). "Primary and secondary *in vitro* generation of cytolytic T lymphocytes in the murine sarcoma virus system." *Eur. J. Immunol.* 5: 227-233.

Powis, S. J., A. R. M. Townsend, E. V. Deverson, J. Bastin, G. W. Butcher and J. C. Howard (1991). "Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter." *Nature* 354: 528-531.

Prehn, R. T. and J. M. Main (1957). "Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas." *J. Natl. Cancer Inst.* 18: 769-778.

Prehn, R. (1975). "Relationship of tumor immunogenicity to concentration of the oncogen." *J. Natl. Cancer Inst.* 55: 189-190.

Rapoport, T. A. (1991). "Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries." *FASEB J.* 5: 2792-2798.

Rechavi, G., D. Givol and E. Canaani (1982). "Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element." *Nature* 300: 607-611.

Restifo, N. P., P. J. Spiess, S. E. Karp, J. J. Mulé and S. A. Rosenberg (1992). "A nonimmunogenic sarcoma transduced with the cDNA for interferon gamma elicits CD8+ T cells against the wild-type tumor: correlation with antigen presentation capability." *J. Exp. Med.* 175: 1423-1431.

Ryser, J.-E., J.-C. Cerottini and K.T Brunner (1978). "Generation of cytolytic T lymphocytes *in vitro*. IX Induction of secondary CTL responses in primary long-term MLC by supernatants from secondary MLC." *J. Immunol.* 120: 370-377.

Sanford, K. K., W. R. Earle and G. D. Likely (1948). "The growth *in vitro* of single isolated tissue cells" *J. Natl. Cancer Inst.* 9: 229-246.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463.

Sanger, F. and A. R. Coulson (1978). "The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing." *FEBS lett.* 87: 107.

Schumacher, T. N. M., M.-T. Heemels, J. J. Neefjes, W. M. Kast, C. J. M. Melief and H. L. Ploegh (1990). "Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and *in vitro*." *Cell* 62: 563-567.

Sibille, C., P. Chomez, C. Wildmann, A. Van Pel, E. De Plaen, J. Maryanski, V. de Bergeyck and T. Boon (1990). "Structure of the gene of tumour transplantation antigen P198 : a point mutation generates a new antigenic peptide." *J. Exp. Med.* 172: 35-45.

Silver, M. L., H.-C. Guo, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1992). "Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide." *Nature* 360: 367-369.

Sjögren, H. O., I. Hellström and G. Klein (1961). "Resistance of polyoma virus-immunized mice to transplantation of established polyoma tumors." *Exp. Cell Res.* 23: 204-208.

Spies, T., M. Bresnahan, S. Bahram, D. Arnold, G. Blanck, E. Mellins, D. Pious and R. DeMars (1990). "A gene in the major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway." *Nature* 348: 744-747.

- Spies, T. and R. DeMars (1991). "Restored expression of major histocompatibility class I molecule by gene transfer of a putative peptide transporter." *Nature* 351: 323-324.
- Steinmetz, M., K. W. Moore, J. G. Frelinger, B. T. Sher, F.-W. Shen, E. A. Boyse and L. Hood (1981). "A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens: transplantation antigens are encoded by eight exons that correlate with protein domains." *Cell* 25: 683-692.
- Steinmetz, M., M. Malissen, L. Hood, A. Orn, R. A. Maki, G. R. Dastoornikoo, D. Stephan, E. Gibb and R. Romaniuk (1984). "Tracts of high or low divergence in the mouse major histocompatibility complex." *EMBO J.* 3: 2995-3003.
- Stephan, D., H. Sun, K. Fischer Lindahl, E. Meyer, G. Hämmerling, L. Hood and M. Steinmetz (1986). "Organization and evolution of D region class I genes in the mouse major histocompatibility complex." *J. Exp. Med.* 163: 1227-1244.
- Sugita, T., T. Totsuka, M. Saito, K. Yamasaki, T. Taga, T. Hirano and T. Kishimoto (1990). "Functional murine interleukin 6 receptor with the intracisternal A particle gene product at its cytoplasmic domain." *J. Exp. Med.* 171: 2001-2009.
- Szikora, J.-P., A. Van Pel, V. Brichard, M. André, N. Van Baren, P. Henry, E. De Plaen and T. Boon (1990). "Structure of the gene of tum^h transplantation antigen P35B : presence of a point mutation in the antigenic allele." *EMBO J.* 9: 1041-1050.
- Szikora, J.-P., A. Van Pel and T. Boon (1993). "Tum^h mutation P35B generates the MHC-binding site of a new antigenic peptide." *Immunogenetics* 37: 135-138.
- Tevethia, S. S., J. W. Blasecki and A. L. Goldstein (1974). "Requirement of thymus-derived $\square$ -positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV40) tumors in mice." *J. Immunol.* 113: 1417-1423.
- Tohyama, K., K. H. Lee, K. Tashiro, T. Kinashi and T. Honjo (1990). "Establishment of an interleukin-5-dependent subclone from an interleukin-3-dependent murine hemopoietic progenitor cell line, LyD9, and its malignant transformation by autocrine secretion of interleukin-5." *EMBO J.* 9: 1823-1830.
- Townsend, A. R. M. and J. J. Skehel (1984). "The influenza A virus nucleoprotein gene controls the induction of both subtype specific and cross-reactive cytotoxic T cells." *J. Exp. Med.* 160: 552-563.
- Townsend, A., F. Gotch and J. Davey (1985). "Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein." *Cell* 42: 457-467.
- Townsend, A., J. Rothbard, F. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith and A. J. McMichael (1986). "The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides." *Cell* 44: 959-968.
- Townsend, A., C. Öhlén, J. Bastin, H.-G. Ljunggren, L. Foster and K. Kärre (1989). "Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides." *Nature* 340: 443-448.
- Traversari, C., P. van der Bruggen, B. Van den Eynde, P. Hainaut, C. Lemoine, N. Ohta, L. Old and T. Boon (1992). "Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes." *Immunogenetics* 35: 145-152.
- Trowsdale, J., I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsend and A. Kelly (1990). "Sequences encoded in the class II of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters." *Nature* 348: 741-744.
- Tyan, M. and L. Cole (1963a). "Differential response to allogenic and xenogenic skin grafts by sublethally irradiated (670 rad) and nonirradiated mice sensitized by various means." *J. Immunol.* 81: 396-402.
- Tyan, M. and L. J. Cole (1963b). "Differential radiosensitivity of first and second-set responses to allogeneic and xenogeneic skin grafts in sublethally irradiated mice." *Transplantation* 1: 546-551.
- Uyttenhove, C., J. Van Snick and T. Boon (1980). "Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice." *J. Exp. Med.* 152: 1175-1183.
- Uyttenhove, C., J. Maryanski and T. Boon (1983). "Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression." *J. Exp. Med.* 157: 1040-1052.
- Van den Eynde, B., B. Lethé, A. Van Pel, E. De Plaen and T. Boon (1991). "The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice." *J. Exp. Med.* 173: 1373-1384.

- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* 254: 1643-1647.
- van der Bruggen, P., J.-P. Szikora, P. Boël, C. Wildmann, M. Somville, M. Sensi and T. Boon (1994). "Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw*1601." *Eur. J. Immunol.* in press.
- Van Pel, A. and T. Boon (1982). "Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4718-4722.
- Van Pel, A., F. Vessière and T. Boon (1983). "Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis." *J. Exp. Med.* 157: 1992-2001.
- Van Pel, A., E. De Plaen and T. Boon (1985). "Selection of a highly transfectable variant from mouse mastocytoma P815." *Som. Cell Genet.* 11: 467-475.
- von Heijne, G. (1990). "The signal peptide." *J. Membr. Biol.* 115: 195-201.
- Ward, P. L., H. Koeppen, T. Hurteau and H. Schreiber (1989). "Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected on autologous normal cells." *J. Exp. Med.* 170: 217-232.
- Ward, P. L., H. K. Koeppen, T. Hurteau, D. A. Rowley and H. Schreiber (1990). "Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8⁺ T-cell-dependent surveillance." *Cancer Res.* 50: 3851-3858.
- Weisburger, J. H. and G. M. Williams (1981). "Carcinogen testing: current problems and new approaches." *Science* 214: 401-407.
- Weynants, P., B. Lethé, F. Brasseur, M. Marchand and T. Boon (1994). "Expression of MAGE genes by non-small-cell lung carcinomas." *Int. J. Cancer* 56: 826-829.
- Whitehead, A. S., H. R. Colten, C. C. Chang and R. DeMars (1985). "Localization of the human MHC-linked complement genes between HLA-B and HLA-DR using HLA mutant cell lines." *J. Immunol.* 134: 641.
- Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub and L. Chasin (1979). "DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1373-1376.
- Wilson, S. H. and E. L. Kuff (1972). "A novel polymerase activity found in association with intracisternal A-type particles." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1531-1536.
- Wilson, S. H., E. W. Bohn, A. Matsukage, K. K. Lueders and E. L. Kuff (1974). "Studies on the relationship between deoxyribonucleic acid polymerase activity and intracisternal A-type particles in mouse myeloma." *Biochem.* 13: 1087-1094.
- Wölfel, T., A. Van Pel, E. De Plaen, C. Lurquin, J. L. Maryanski and T. Boon (1987). "Immunogenic (tum^r) variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VIII. Detection of stable transfectants expressing a tum^r antigen with a cytolytic T cell stimulation assay." *Immunogenetics* 26: 178-187.
- Yewdell, J. W. and J. R. Bennink (1989). "Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes." *Science* 244: 1072-1075.
- Ymer, S., W. Q. J. Tucker, C. J. Sanderson, A. J. Hapel, H. D. Campbell and I. G. Young (1985). "Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene." *Nature* 317: 255-258.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of *in vitro* T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system." *Nature* 248: 701-702.